



# **Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Farmacia y Bioquímica**

**Escuela Académico Profesional de Farmacia y Bioquímica**

## **Desarrollo y validación de un método analítico para valoración de metronidazol, clotrimazol y lidocaína clorhidrato en óvulos vaginales, por cromatografía de líquidos (HPLC)**

### **TESIS**

**Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico**

### **AUTOR**

**Denis Danilo CHIPANA PAULINO**

### **ASESOR**

**Norma Angélica CARLOS CASAS**

**Lima, Perú**

**2016**



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Chipana D. Desarrollo y validación de un método analítico para valoración de metronidazol, clotrimazol y lidocaína clorhidrato en óvulos vaginales, por cromatografía de líquidos (HPLC) [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Académico Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2016.

---



**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)  
**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**  
**DECANATO**



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS**

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

**“DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA  
VALORACIÓN DE METRONIDAZOL, CLOTRIMAZOL Y LIDOCAÍNA  
CLORHIDRATO EN ÓVULOS VAGINALES, POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS  
(HPLC)”**

Que presenta el Bachiller en Farmacia y Bioquímica:


**DENIS DANILO CHIPANA PAULINO**


Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, y practicada la votación han obtenido la siguiente calificación:

Diecisiete (17) Sobresaliente


en conformidad con el Art. 34.º del Reglamento para la obtención del Grado Académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica y Título Profesional de Químico Farmacéutico de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Lima, 07 de marzo del 2016

  
**Q.F. Alfredo Alonzo Castillo Calle**  
Presidente

  
**Mgtr. Delia Yolanda Whu Whu**  
Miembro

  
**Mgtr. César Augusto Canales Martínez**  
Miembro

  
**Q.F. Fredy Enrique Quispe Jacobo**  
Miembro



## DEDICATORIAS

*A mis padres. A quienes sin su esfuerzo, ayuda, consejos, comprensión no hubiese podido terminar mi carrera ya que ellos son el ejemplo para mi.*

*A mi hermana: Katty. A quien estimo y quiero con todo mi corazón, por comprenderme y apoyarme en momentos fundamentales de mi vida y por estar siempre conmigo en las buenas y en las malas.*

*A mi esposa: Ericka. A quien quiero y amo mucho, porque es la impulsadora de todas mis metas, de todos mis proyectos y con quien voy a compartir todos los días de mi vida.*

*A mi hijo: Mateo Alejandro que es el motor de mi vida y a quien voy a querer y amar mucho todos los días de mi vida.*

## **AGRADECIMIENTOS**

*Por el apoyo incondicional que me brindan, en cada paso que doy hacia mi formación profesional y personal agradezco a toda mi familia en especial a mis padres:*

*Chipana Roldán, Juan Alberto*

*Paulino López de Chipana, Olga Rosa*

*Un agradecimiento especial, por el apoyo y el asesoramiento para la realización de presente trabajo, gracias:*

*Dra. Norma A. Carlos Casas*

*A mis compañeros y amigos, que luego de haber compartido muchos momentos maravillosos tanto en las aulas como fuera de ellas logramos construir grandes lazos de hermandad y unión. Es por esto que siempre los tendré en mente y corazón.*

*A Medifarma S.A por haberme dado la confianza, y permitirme ser parte su equipo de trabajo .*

***Denis Danilo Chipana Paulino***

## ABREVIATURAS

- **HPLC:** Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia o Cromatografía de Líquidos
- **USP:** United States Pharmacopeia
- **DIGEMID:** Dirección General de Medicamentos, Insumos y Drogas
- **FDA:** Food and Drug Administration
- **OMS:** Organización Mundial de la Salud
- **AOAC:** Association of Official Analytical Chemistry
- **ICH:** International Conference on Harmonisation
- **k':** Factor de capacidad
- **T<sub>R</sub>:** Tiempo de retención
- **RSD:** Desviación Estándar Relativa
- **SD:** Desviación Estándar
- **t/c:** Potencia tal cual (sin humedad)

## RESUMEN

Se desarrolló una técnica analítica por cromatografía líquida de alta eficiencia para cuantificar los principios activos metronidazol, clotrimazol y lidocaína clorhidrato en óvulos vaginales, debido a que la técnica de análisis para este medicamento compuesto no se encuentra en libros oficiales. La técnica de análisis para los tres principios activos es realizada en dos sistemas cromatográficos diferentes, por lo que no pueden ser cuantificadas en un solo cromatograma, debido a la gran diferencia de sus concentraciones de los principios activos en los óvulos vaginales.

Previamente a la validación se evaluó la aptitud del sistema. Los resultados fueron conformes a las especificaciones para un método cromatográfico recomendadas por la USP 38, comprobando que el equipo, el sistema electrónico, las operaciones analíticas y las muestras a analizar constituyen un sistema integral que puede evaluarse como tal.

Para la validación se evaluaron los parámetros de desempeño de la técnica como son: Especificidad, Linealidad, Exactitud, Precisión, Robustez y Rango. El método desarrollado para metronidazol, clotrimazol y clorhidrato de lidocaína es específico porque identifica específicamente los 3 principios activos. Es lineal en el intervalo de concentración seleccionado (50% a 150% de la concentración teórica), con un coeficiente de correlación mayor de 0.995. Es exacto porque se obtuvieron porcentajes de recuperación entre 98% y 102%. Es preciso porque se obtuvieron coeficientes de variación menores a 2%. Es robusto (solo para el metronidazol) porque al realizar pequeñas modificaciones no es afectado por estos cambios.



Los resultados de estos parámetros se sometieron a pruebas estadísticas demostrando que la técnica analítica propuesta para la cuantificación de los principios activos es específica, exacta, precisa, robusta y lineal, así mismo, garantizando la confiabilidad de la nueva técnica.

**Palabras claves:** metronidazol, clotrimazol, lidocaína clorhidrato, cromatografía líquida de alta eficiencia, validación, técnica analítica.

## **SUMMARY**

*An analytical technique for high performance liquid chromatography to quantify the active ingredients metronidazole, clotrimazole and lidocaine hydrochloride, because the technique of analysis for the drug compound is not developed in official books. The analytical technique for the three substances is performed in two different chromatographic systems, so they cannot be quantified in a single chromatogram due to the large difference in the concentrations of active ingredients in vaginal ovules.*

*Previously to the validation system suitability was evaluated. The results were in accordance with the specifications for a chromatographic method recommended by the USP 38, checking that the equipment, electronics, analytical operations and samples to be analyzed constitute an integral system that can be evaluated as such. To validate the performance parameters of the technique was evaluated as: Specificity, linearity, accuracy, precision, robustness and range.*

*The method developed for metronidazole, clotrimazole, lidocaine hydrochloride is specific because it specifically identifies 3 active ingredients. It is linear over the range of selected concentrations (50% to 150% of the theoretical concentration), with a coefficient of correlation greater than 0.995. It is precise because recovery rates between 98% and 102% were obtained. It is precise because the coefficients of variation were less than 2%. It is robust (for metronidazole alone) because making small changes is not affected by these changes.*

*The results of these parameters are subjected to statistical tests showing that the analytical technique proposal for the quantification of the active ingredients is specified, accurate , precise , rugged and linear also ensuring the reliability of the new technique.*

**Key words:** *metronidazole, clotrimazole, lidocaine hydrochloride, high performance liquid chromatography, validation, analytical technique.*

## ÍNDICE GENERAL

### I. INTRODUCCIÓN

1.1. Objetivo General	3
1.2. Objetivos Específicos	3
1.3. Hipótesis	3

### II. GENERALIDADES

2.1. Principios Activos	4
2.1.1. Metronidazol	4
2.1.1.1. Propiedades físicas y químicas	4
2.1.1.2. Propiedades farmacológicas	4
2.1.2. Clotrimazol	5
2.1.2.1. Propiedades físicas y químicas	5
2.1.2.2. Propiedades farmacológicas	5
2.1.3. Lidocaína Clorhidrato	6
2.1.3.1. Propiedades físicas y químicas	6
2.1.3.2. Propiedades farmacológicas	6
2.2. Cromatografía de Líquidos (HPLC)	7
2.2.1. Concepto	7
2.2.2. Partes	7
2.2.2.1. Fase Estacionaria y Fase Móvil	7
2.2.2.2. Bomba	8
2.2.2.3. Inyectores	8
2.2.2.4. Detectores	8
2.2.2.5. Sistemas de toma y procesamiento de datos	9
2.2.3. Establecimiento del método en cromatografía de líquidos	10

2.2.3.1. Selección de la columna	10
2.2.3.2. Selección de la fase móvil	10
2.3. Calificación del Sistema	11
2.3.1. Calificación del HPLC	11
2.4. Método Analítico	12
2.4.1. Concepto	12
2.4.2. Fases en el desarrollo de un método analítico	12
2.5. Validación de métodos analíticos	13
2.5.1. Concepto	13
2.5.2. Tipos	13
2.5.2.1. Validación Prospectiva	13
2.5.2.2. Validación Concurrente	14
2.5.2.3. Validación Retrospectiva	14
2.5.2.4. Revalidación	14
2.5.3. Fases	15
2.5.4. Características del desempeño analítico	15
2.5.4.1. Exactitud	15
2.5.4.2. Precisión	16
2.5.4.3. Especificidad	16
2.5.4.4. Límite de detección, Límite de Cuantificación	17
2.5.4.5. Linealidad e Intervalo (Rango)	17
2.5.4.6. Robustez	18
2.5.5 Criterios de Validación a estudiar en función del tipo de método analítico	18

III. PARTE EXPERIMENTAL	
3.1 Materiales	20
3.2 Reactivos	20
3.3 Equipos	21
3.4 Muestra	21
3.5 Estándares	21
3.6 Establecimiento del Método Analítico	22
3.7 Análisis de datos	27
3.8 Método Analítico por Cromatografía de Líquidos (HPLC) para Metronidazol	27
3.9 Validación del Método Analítico para Metronidazol	29
3.10 Método Analítico por Cromatografía de Líquidos (HPLC) para Clorhidrato de Lidocaína y Clotrimazol	45
3.11 Validación del Método Analítico para Clorhidrato de Lidocaína y Clotrimazol	47
IV. RESULTADOS	75
V. DISCUSION	81
VI. CONCLUSIONES	83
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	84
VIII. ANEXOS	88

## I. INTRODUCCION

En el mercado farmacéutico actual existen varios medicamentos de gran demanda por la población, cuyas técnicas de análisis no se encuentran publicadas en las obras oficiales que generalmente se consultan (Farmacopea Americana, Británica, Europea y Japonesa). Esto hace necesario desarrollar nuevas técnicas de análisis en el laboratorio con el fin de separar y cuantificar los principios activos de dichos medicamentos.

Por lo tanto, el desarrollo y validación de técnicas analíticas para medicamentos es una tarea que se viene realizando en diferentes laboratorios farmacéuticos peruanos en los últimos años, debido a las exigencias de calidad y por exigencias normativas de Dirección General de Medicamentos, Insumos y Drogas (DIGEMID).

Los procedimientos para la evaluación de los niveles de calidad de los medicamentos en el país están dados por la DIGEMID a través del Manual de Buenas Prácticas de Manufactura de Productos Farmacéuticos, como instrumento normativo necesario para exigir la calidad en la fabricación de los productos farmacéuticos.

Este organismo gubernamental se rige, a su vez, de reglamentaciones dadas por organismos internacionales reconocidos oficialmente como *Food and Drug Administration* (FDA), Organización Mundial de la Salud (OMS), *Association of Official Analytical Chemistry* (AOAC), Conferencia Internacional Tripartita sobre Armonización (ICH), Farmacopea Europea y Farmacopea Americana.

En el presente trabajo se ha desarrollado una técnica de análisis para cuantificar metronidazol 500 mg, clotrimazol 100 mg y clorhidrato de lidocaína 7 mg en óvulos vaginales por cromatografía de líquidos (HPLC).

Las razones de la preferencia de esta técnica son por su especificidad, por su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, por su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y, sobre todo, por su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria farmacéutica y en muchos campos de la ciencia.

Así mismo, para el desarrollo de la técnica fue necesario conocer las propiedades fisicoquímicas de los principios activos: peso molecular, estructura química, solubilidad y las propiedades de la formulación.

Finalmente, la técnica fue validada según lo recomendado en la USP 38 NF 33, realizando una aptitud del sistema y evaluando el método con los parámetros de desempeño en cuanto a especificidad, linealidad, exactitud, precisión, robustez y rango.

Este trabajo aportará conocimientos técnico-científicos que pueden ser aplicados en la actividad de las áreas de control de calidad e investigación de los laboratorios farmacéuticos del país.



## **1.1 OBJETIVO GENERAL**

Desarrollar una técnica analítica por Cromatografía de Líquidos (HPLC) para cuantificar metronidazol, clotrimazol y clorhidrato de lidocaína en óvulos vaginales.

## **1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1.2.1. Establecer un método de análisis por cromatografía de líquidos (HPLC) para cuantificar metronidazol, clotrimazol y clorhidrato de lidocaína en óvulos vaginales.

1.2.2. Validar la técnica analítica para cuantificar metronidazol, clotrimazol y clorhidrato de lidocaína en óvulos vaginales.

1.2.3. Lograr la conformidad del medicamento respecto a las especificaciones garantizando su calidad.

## **1.3 HIPOTESIS**

La técnica analítica desarrollada para la cuantificación de metronidazol, clotrimazol y clorhidrato de lidocaína en óvulos vaginales por Cromatografía de Líquidos (HPLC) cumple con los parámetros de validación.

## II. GENERALIDADES

### 2.1.Principios Activos

#### 2.1.1 Metronidazol

##### 2.1.1.1 Propiedades físicas y químicas

Fórmula molecular:  $C_6H_9N_3O_3$

Estructura molecular:

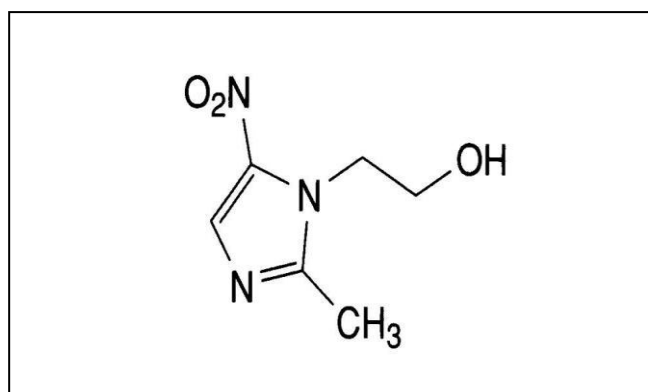


Figura N° 1. Estructura molecular del Metronidazol

Peso molecular: 171.15

Apariencia: polvo blanco

Olor: inodoro

Punto de fusión:  $290^{\circ}C$

Solubilidad: moderadamente soluble en agua y en alcohol <sup>(1)</sup>

##### 2.1.1.2 Propiedades Farmacológicas

El metronidazol es un antibiótico y antiparasitario del grupo de los nitroimidazoles. Inhibe la síntesis del ácido nucleico y es utilizado para el tratamiento de las infecciones provocadas

por protozoarios y bacterias anaeróbicas. Se administra por vía oral, intravenosa, intravaginal y cutánea. <sup>(2)</sup>

## 2.1.2 Clotrimazol

### 2.1.2.1 Propiedades físicas y químicas

Fórmula molecular:  $C_{22}H_{17}N_2Cl$

Estructura molecular:

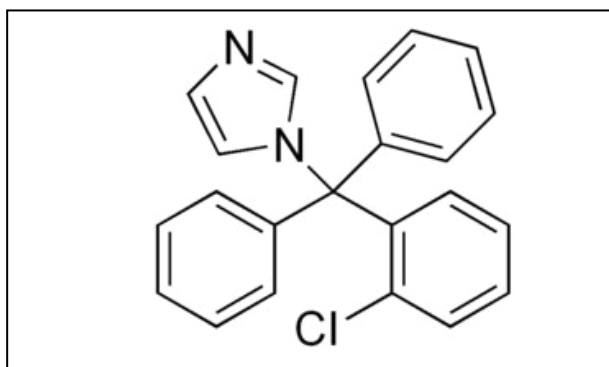


Figura N° 2. Estructura molecular del Clotrimazol

Peso molecular: 344.837

Apariencia: polvo cristalino blanco

Olor: inodoro

Punto de fusión: 142°C

Solubilidad: insoluble en agua, fácilmente soluble en metanol y alcohol. <sup>(1)</sup>

### 2.1.2.2 Propiedades Farmacológicas

El clotrimazol es un medicamento antimicótico usado para el tratamiento de infecciones tales como las infecciones vaginales por levaduras y candidiasis oral. El mecanismo de acción principal del

clotrimazol es la inhibición de la división y crecimiento de hongos. El clotrimazol altera la permeabilidad de la pared celular fúngica e inhibe la actividad de enzimas dentro de la célula. No se administra sistémicamente. <sup>(2)</sup>

### 2.1.3 Clorhidrato de Lidocaína

#### 2.1.3.1 Propiedades físicas y químicas

Fórmula molecular:  $C_{14}H_{22}N_2O \cdot HCl$

Estructura molecular:

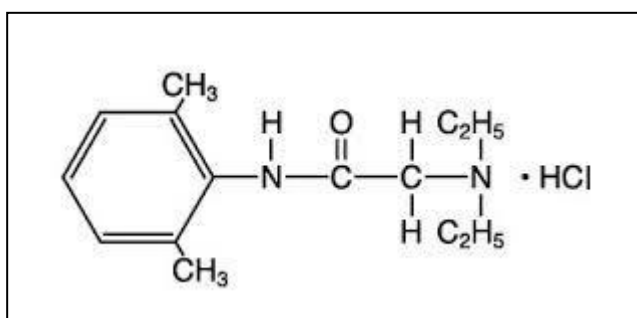


Figura N° 3. Estructura molecular de clorhidrato de lidocaína

Peso molecular: 270.8

Apariencia: polvo cristalino blanco

Olor: inodoro

Punto de fusión: 74 - 79°C

Solubilidad: soluble en agua y en alcohol <sup>(1)</sup>

#### 2.1.3.2 Propiedades Farmacológicas

La lidocaína pertenece al grupo de los anestésicos locales, del tipo de las amino amidas. Actúa bloqueando la propagación del impulso

nervioso impidiendo la entrada de iones sodio a través de la membrana nerviosa.<sup>(2)</sup>

## **2.2 Cromatografía de Líquidos (HPLC)**

### **2.2.1. Concepto**

La cromatografía de líquidos es una técnica de separación basada en una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida. Las separaciones se logran por procesos de partición, adsorción o intercambio iónico, según el tipo de fase estacionaria empleada.<sup>(3)</sup>

### **2.2.2. Partes**

#### **2.2.2.1. Fase Estacionaria y Fase Móvil.**

Para la mayoría de los análisis farmacéuticos, la separación se logra por la partición de los compuestos presentes en la solución de prueba entre la fase móvil y la estacionaria. Los sistemas que constan de fases estacionarias polares y fases móviles no polares se describen como de fase normal, mientras que, por el contrario, cuando se emplean fases móviles polares y fases estacionarias no polares se denomina cromatografía en fase reversa.<sup>(4)</sup>

Las fases estacionarias líquidas deben ser en gran medida inmiscibles con la fase móvil. Generalmente, es necesario saturar previamente la fase móvil con la fase estacionaria para impedir la redisolución de la fase estacionaria de la columna. Las fases estacionarias poliméricas (encapadas) recubiertas sobre el soporte son más duraderas. Las columnas pueden calentarse para proporcionar separaciones más

eficaces pero rara vez se las utiliza a temperaturas por encima de los 60° C, debido a la potencial degradación de la fase estacionaria o la volatilidad de la fase móvil. <sup>(4)</sup>

#### **2.2.2.2. Bomba**

Los sistemas de bombeo administran cantidades exactas de fase móvil desde los recipientes hasta la columna mediante una tubería y uniones adecuadas para altas presiones. Existen 3 tipos de bombas, cada una con sus propias ventajas y desventajas: bombas recíprocas, bombas de jeringa o desplazamiento y bombas neumáticas o de presión constante. <sup>(4)</sup>

#### **2.2.2.3. Inyectores**

Después de ser disueltos en la fase móvil u otra solución apropiada, los compuestos que se van a analizar se inyectan en la fase móvil, ya sean manualmente usando jeringas o inyectores de espiral o bien automáticamente mediante el uso de inyectores automáticos. Los inyectores automáticos pueden programarse para controlar el volumen de muestreo, el número de inyecciones, y los ciclos de enjuague del espiral, el intervalo entre las inyecciones y otras variables operativas. <sup>(4)</sup>

#### **2.2.2.4. Detectores**

La mayoría de métodos de HPLC usados actualmente requieren del uso de detectores espectrofotométricos. Este tipo de detector consta de una celda de flujo colocada en el extremo de la columna. Un haz

de radiación UV pasa a través de la celda de flujo y se introduce en el detector. A medida que los compuestos eluyen de la columna, pasan a través de la celda y absorben la radiación lo que da lugar a cambios cuantificables en el nivel de energía. Existen detectores de longitud de onda fija, variable y múltiple; siendo el más utilizado los detectores de longitud de onda variable, porque permiten seleccionar libremente la longitud de onda de trabajo, escogiendo la mayor absorción del analito. Para la investigación de desarrollo de técnicas analíticas se recomienda utilizar el detector de arreglo de diodos que emplea un conjunto de fotodiodos, para conseguir la luz transmitida en todo el espectro de absorción del eluido en tiempo real.

Los detectores nos permiten ver y ubicar en tiempo y espacio la posición de cada componente de una muestra a la salida de la columna cromatográfica.<sup>(4)</sup>

#### **2.2.2.5. Sistemas de toma y procesamiento de datos**

Las estaciones de datos modernas reciben y almacenan la señal de los detectores e imprimen el cromatograma completo con las alturas y las áreas de los picos, la identificación de la muestra y las variables del método. Se emplean también para programar la cromatografía de líquidos, controlando la mayoría de las variables y proporcionando periodos largos de operación sin necesidad de supervisión. El resultado del ensayo cromatográfico es la obtención de fracciones separadas de un gráfico o cromatograma de cuya interpretación pueden extraerse conclusiones cualitativas y cuantitativas.<sup>(4)</sup>

### **2.2.3. Establecimiento del método en cromatografía de líquidos**

#### **2.2.3.1. Selección de la columna**

Una correcta cromatografía con fases móviles interactivas, requieren de un equilibrio adecuado entre las fuerzas intermoleculares existentes entre los 3 participantes activos en el proceso de la separación: el soluto, la fase móvil y la fase estacionaria. Estas fuerzas intermoleculares se describen cualitativamente en términos de polaridad relativa de cada uno de los reactivos.

Al elegir una columna para una separación cromatográfica, la polaridad de la fase estacionaria debe ser bastante similar a la de los analitos y para la elución, se utiliza una fase móvil con una polaridad considerablemente distinta. <sup>(4)</sup>

#### **2.2.4.2 Selección de la fase móvil**

En cromatografía de líquidos, el factor de capacidad  $k'$  (constante de solubilidad) se puede manipular fácilmente, debido a que este parámetro depende considerablemente de la composición de la fase móvil, todo esto con la finalidad de mejorar la resolución de una columna cromatográfica. Para una eficiencia optima,  $k'$  debería estar en el intervalo comprendido entre 2 y 5; sin embargo para mezclas complejas, ese intervalo se ha de extender tal vez de 0.5 a 20 para que todos los picos de los componentes tengan tiempo de aparecer. <sup>(4)</sup>



## 2.3. Calificación del Sistema

La calificación es la ejecución de pruebas para determinar si un componente de un proceso posee los atributos requeridos para trabajar correctamente y conducir verdaderamente a los resultados esperados..

La calificación del sistema es una premisa necesaria para poder validar. Para llevar a cabo la calificación se procede a la calibración del equipo y a la comprobación de métodos y sistemas. <sup>(5)</sup>

### 2.3.1. Calificación del HPLC

Las etapas de la calificación son:

- **Calificación del diseño (DQ):** Establecer y proveer evidencia documentaria que las premisas, los sistemas auxiliares, equipos y procesos han sido diseñados de acuerdo a los requerimientos de las Buenas Prácticas de Manufactura.
- **Calificación de la Instalación (IQ):** Establecer con evidencia objetiva que todos los aspectos claves del proceso del equipo y sistemas auxiliares de la instalación se adhieren a la especificación aprobada del fabricante y que las recomendaciones del proveedor del equipo están consideradas convenientemente.
- **Calificación Operacional (OQ):** Establecer por límites objetivos del control del proceso de evidencia y niveles de acción que tienen como resultado al producto que reúne todos los requisitos predeterminados.

- **Calificación de la Performance (PQ):** Establecer por evidencia objetiva que el proceso, bajo condiciones anticipadas, produce constantemente un producto que reúne todos los requisitos predeterminados. <sup>(5)</sup>

## **2.4. Método Analítico**

### **2.4.1. Concepto**

El método analítico se refiere a la forma de realizar el análisis. Este debe describir en detalle los pasos necesarios para realizar cada prueba analítica. Esta puede incluir a las preparaciones de la muestra, los estándares de referencia y los reactivos, uso de aparatos, generación de la curva de calibración, uso de la fórmula para los cálculos, etc.

### **2.4.2. Fases en el desarrollo de un método analítico**

El desarrollo lógico del método analítico transcurre en tres fases:

- Definición de las características y requerimientos que debe satisfacer el método analítico: precisión exigible, sensibilidad deseable, grado de selectividad, tiempo, costo, tipo de instrumentación necesaria, etc.
- Puesta a punto del método analítico, desde los primeros estudios de tanteo con patrones hasta la utilización del método en muestras reales, pasando por la definición de los parámetros de idoneidad que garanticen el buen funcionamiento del sistema en el método del análisis.

- Validación del método analítico, esta tercera etapa permitirá conocer la fiabilidad del método para su aplicación rutinaria y en combinación con las etapas anteriores, sus características de funcionamiento con consecuencias positivas para su rendimiento. <sup>(6)</sup>

## **2.5. Validación de métodos analíticos**

### **2.5.1. Concepto**

Se llama validación a la obtención de pruebas, convenientemente documentadas, demostrativas de que un método de fabricación o control es lo suficientemente fiable como para producir el resultado previsto dentro de intervalos definidos. <sup>(7)</sup>

Según USP, “la validación de un método analítico es el proceso que establece mediante estudios en laboratorio, que las características del desempeño del método cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas”. <sup>(3)</sup>

La validación es necesaria porque proporciona un alto grado de confianza y seguridad en el método analítico y en la calidad de los resultados.

### **2.5.2. Tipos**

#### **2.5.2.1. Validación Prospectiva**

Se realiza cuando la verificación del cumplimiento de las condiciones establecidas para un proceso o método analítico se lleva a cabo antes de la comercialización del producto. Este tipo de validación se aplica

cuando se elabora un nuevo método analítico.. Comprende el estudio de todos los criterios necesarios para demostrar el buen funcionamiento del método. <sup>(8)</sup>

#### **2.5.2.2 Validación Concurrente**

Se define como el establecimiento de un programa documentado que proporciona un alto grado de seguridad de que un proceso específico producirá consistentemente una forma farmacéutica que lleva las especificaciones predeterminadas y los atributos de calidad y que se sustenta en datos o información obtenidos a partir de un procesos que se encuentra en marcha, o en el cual se ha introducido alguna variación. <sup>(8)</sup>

Se realiza cuando un producto se fabrica industrialmente para su salida comercial.

#### **2.5.2.3 Validación Retrospectiva**

Se realiza cuando la idoneidad del método o proceso analítico se basa en la garantía constatada a través de los datos analíticos del producto ya comercializado, se aplica a métodos no validados previamente y de los que se tiene una amplia historia de resultados. <sup>(8)</sup>

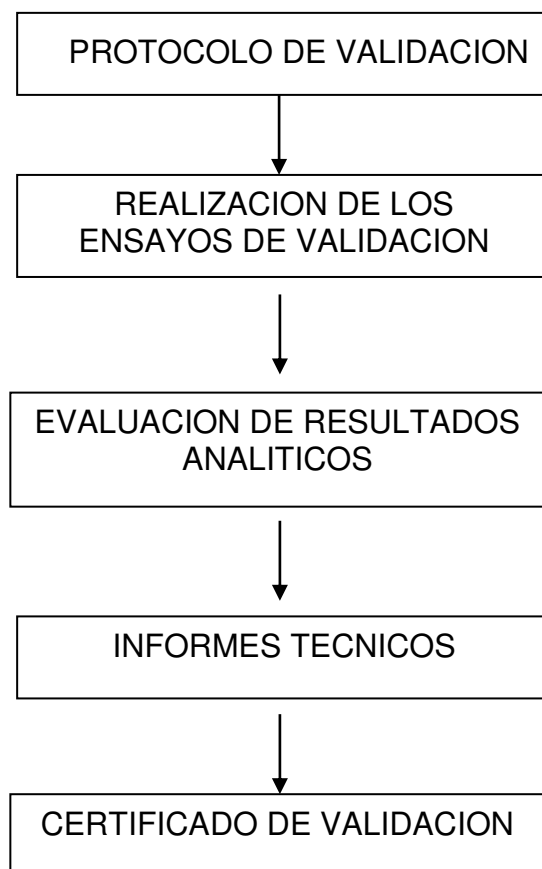
#### **2.5.2.4 Revalidación**

La introducción de un cambio que pueda afectar la idoneidad del método analítico establecido por la validación, podrá exigir una nueva validación, es decir, una revalidación total o parcial de dicho método

analítico. Los criterios a estudiar se deciden en función del tipo de cambio efectuado.<sup>(8)</sup>

### 2.5.3 Fases

El siguiente esquema resume las fases de que consta una validación:



### 2.5.4 Características del desempeño analítico

#### 2.5.4.1 Exactitud

La exactitud de un método analítico es la proximidad entre los resultados de prueba obtenidos mediante ese método y el valor verdadero. La exactitud de un método analítico debe establecerse en todo su intervalo.<sup>(3)</sup>

#### **2.5.4.2 Precisión**

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica el método repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea.

La precisión de un método analítico habitualmente se expresa como la desviación estándar o la desviación estándar relativa (coeficiente de variación) de una serie de mediciones. La precisión puede ser una medida del grado de reproducibilidad o de repetibilidad del método analítico en condiciones normales de operación. En este contexto, la reproducibilidad se refiere al uso del procedimiento analítico en diferentes laboratorios, por ejemplo en un estudio en colaboración.

Una precisión intermedia expresa la variación dentro de un laboratorio, por ejemplo en diferentes días, con diferentes analistas o con equipos diferentes dentro del mismo laboratorio. La repetibilidad se refiere a la realización del procedimiento analítico en un laboratorio durante un periodo de tiempo corto realizado por el mismo analista con el mismo equipo.<sup>(3)</sup>

#### **2.5.4.3 Especificidad**

Los documentos de Conferencia Internacional Tripartita sobre Armonización (ICH) definen especificidad como la capacidad de evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de aquellos componentes cuya presencia resulta previsible, como impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz.<sup>(8)</sup>

La especificidad es una condición esencial para conseguir una buena exactitud por lo que es, en todos los casos, un criterio clave.

#### **2.5.4.4 Límite de detección y Límite de cuantificación**

Estos parámetros se relacionan con la cantidad de analito requerida para dar un resultado significativo, cualitativo o cuantitativo.

Según USP, el límite de detección es una característica de las pruebas de límite. Es la cantidad mínima de analito que puede detectarse en una muestra, aunque no necesariamente cuantificarse, en las condiciones experimentales indicadas. Las pruebas de límite simplemente comprueban que la cantidad de analito se encuentra por encima o por debajo de su nivel determinado. <sup>(3)</sup>

Según USP, el límite de cuantificación es la mínima cantidad de analito en una muestra que se puede determinar con precisión y exactitud aceptables en las condiciones experimentales indicadas. <sup>(3)</sup>

#### **2.5.4.5 Linealidad e Intervalo (Rango)**

La linealidad de un método analítico es su capacidad para obtener resultados de prueba que sean proporcionales (ya sea de modo directo o por medio de una transformación matemática bien definida) a la concentración de analito en muestras en un intervalo dado. <sup>(3)</sup>

El intervalo o rango de un método analítico es la amplitud entre las concentraciones inferior y superior del analito (incluyendo esos niveles), en la cual se puede determinar el analito en un nivel adecuado

de precisión, exactitud y linealidad, utilizando el método según se describe por escrito. <sup>(3)</sup>

#### **2.5.4.6 Robustez**

La robustez de un método analítico es una medida de su capacidad para no resultar afectado por pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método y proporciona una indicación de su confiabilidad durante su uso normal. <sup>(3)</sup>

#### **2.5.5 Criterios de Validación a estudiar en función del tipo de método analítico**

Según USP, diferentes métodos de prueba requieren diferentes esquemas de validación.

Las categorías de los métodos de prueba se indican a continuación:

- **Categoría I:** Métodos analíticos para la cuantificación de los componentes principales de fármacos a granel o ingredientes activos (incluyendo conservantes) en productos farmacéuticos terminados.
- **Categoría II:** Métodos analíticos para la determinación de impurezas en fármacos a granel o productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Estos métodos incluyen análisis cuantitativos y pruebas de límite.



- **Categoría III:** Métodos analíticos para la determinación de las características de desempeño (por ejemplo, disolución, liberación del fármaco).
- **Categoría IV:** Pruebas de identificación

Para cada categoría de análisis, se requiere diferente información analítica.

En la tabla N° 1 se indican los elementos de datos que normalmente se requieren para cada una de las categorías de análisis. <sup>(3)</sup>

**Tabla N° 1.** Datos requeridos para la validación <sup>(3)</sup>

Características de desempeño analítico	CATEGORIA I	CATEGORIA II		CATEGORIA III	CATEGORIA IV
		Prueba de limite cuantitativa	Prueba de limite cualitativa		
Exactitud	SI	SI	*	*	NO
Precision	SI	SI	NO	SI	NO
Especificidad	SI	SI	SI	*	SI
Limite de deteccion	NO	NO	SI	*	NO
Limite de cuantificacion	NO	SI	NO	*	NO
Linealidad	SI	SI	NO	*	NO
Intervalo	SI	SI	*	*	NO

### **III. PARTE EXPERIMENTAL**

#### **3.1 MATERIALES**

- Pipeta volumétrica de vidrio Tipo “A” de 2 mL
- Pipeta volumétrica de vidrio Tipo “A” de 3 mL
- Pipeta volumétrica de vidrio Tipo “A” de 4 mL
- Pipeta volumétrica de vidrio Tipo “A” de 5 mL
- Pipeta volumétrica de vidrio Tipo “A” de 6 mL
- Pipetas graduadas de 5 mL
- Matraces volumétricos de vidrio Tipo “A” de 25 mL
- Matraces volumétricos de vidrio Tipo “A” de 50 mL
- Matraces volumétricos de vidrio Tipo “A” de 100 mL
- Probetas de 1000 mL
- Viales ámbar de 2 mL de vidrio Tipo “A” con tapa y septa

#### **3.2 Reactivos**

Para el desarrollo y validación del método analítico se utilizó Fosfato dibásico de potasio grado reactivo (*Merck*), lote A333304147; Metanol grado HPLC (*Merck*), lote I620007202 y agua purificada ultra pura a partir del equipo *Milli-Q Advantage A10*.

### 3.3 Equipos

Para el metronidazol, los análisis se realizaron en un cromatógrafo *Agilent Technologies* 1200 DAD con detector UV-Vis con arreglo de diodos y en cromatógrafo *Agilent Technologies* 1200 con detector UV-Vis, utilizando una columna cromatográfica *Lichrosphere* 100 RP-8 de 125 x 4.0 mm con un tamaño de partícula de 5 µm.

Para el clorhidrato de lidocaína y clotrimazol, los análisis se realizaron en un cromatógrafo *Agilent Technologies* 1200 DAD con detector UV-Vis con arreglo de diodos y un cromatógrafo *Agilent Technologies* 1200 con detector UV-Vis, utilizando una columna cromatográfica *Zorbax* XDB de 150 x 4.6 mm con un tamaño de partícula de 5 µm.

### 3.4 Muestra

Las muestras de óvulos vaginales de Metronidazol 500 mg, Clotrimazol 100 mg y Lidocaína Clorhidrato 7 mg fueron obtenidos de un lote de producción fabricado en las instalaciones del laboratorio Medifarma S.A.

### 3.5 Estándares

Los estándares secundarios fueron verificados y contrastados con estándares primarios, de los análisis se obtuvieron los siguientes datos, descrito en la tabla N°2.

**Tabla N°2.** Estándares secundarios utilizados en la validación del método analítico

<b>Estándar Secundario</b>	<b>Potencia</b>	<b>Fecha de Expira</b>
Metronidazol	98.9%	Abril 2016
Clotrimazol	99.6%	Marzo 2016
Lidocaína Clorhidrato	93.75%	Junio 2016

### **3.6 ESTABLECIMIENTO DEL METODO ANALITICO**

Para determinar el medio de extracción apropiado se tuvieron en cuenta las solubilidades de los principios activos. Según USP 38, el metronidazol es ligeramente soluble en agua y fácilmente soluble en metanol; el clotrimazol es fácilmente soluble en metanol e insoluble en agua y el clorhidrato de lidocaína es fácilmente soluble en agua y metanol. Por lo que se optó el metanol como medio de extracción para el desarrollo de la técnica de análisis.

Los principios activos (metronidazol, clotrimazol y lidocaína clorhidrato) se cuantificaron individualmente. Para establecer la longitud de onda de análisis de los analitos, se tuvo en cuenta lo descrito individualmente en la USP 38. El metronidazol, clotrimazol y lidocaína clorhidrato se analizan a 254 nm.

Debido a que los principios activos son de naturaleza polar, se selecciona una fase móvil compuesta por solventes de naturaleza polar y medianamente polar para el metronidazol, tales como agua y metanol y para lograr una mejor afinidad con la fase estacionaria, se utiliza el buffer fosfato

dibásico de potasio y metanol para el clotrimazol y el clorhidrato de lidocaína.

Para la separación del metronidazol se utiliza una columna cromatográfica L7 cuyo relleno se encuentra compuesto de octilsilano unido químicamente a sílice porosa de 5 µm de diámetro.

Para la separación del clotrimazol y el clorhidrato de lidocaína se utiliza una columna L1 cuyo relleno se encuentra compuesto de octadecilsilano unido químicamente a sílice porosa de 5 µm de diámetro.

El análisis se desarrolla a una temperatura de 30°C y volumen de inyección de 20 µL para el Metronidazol,

El análisis se desarrolla a una temperatura de 30°C y volumen de inyección de 50 µL para el clotrimazol y el clorhidrato de lidocaína.

Con estas condiciones cromatográficas se inyecta muestras de estándares de metronidazol, clotrimazol y clorhidrato de lidocaína obteniéndose sus respectivos cromatogramas, según Figura N° 4 y 5.

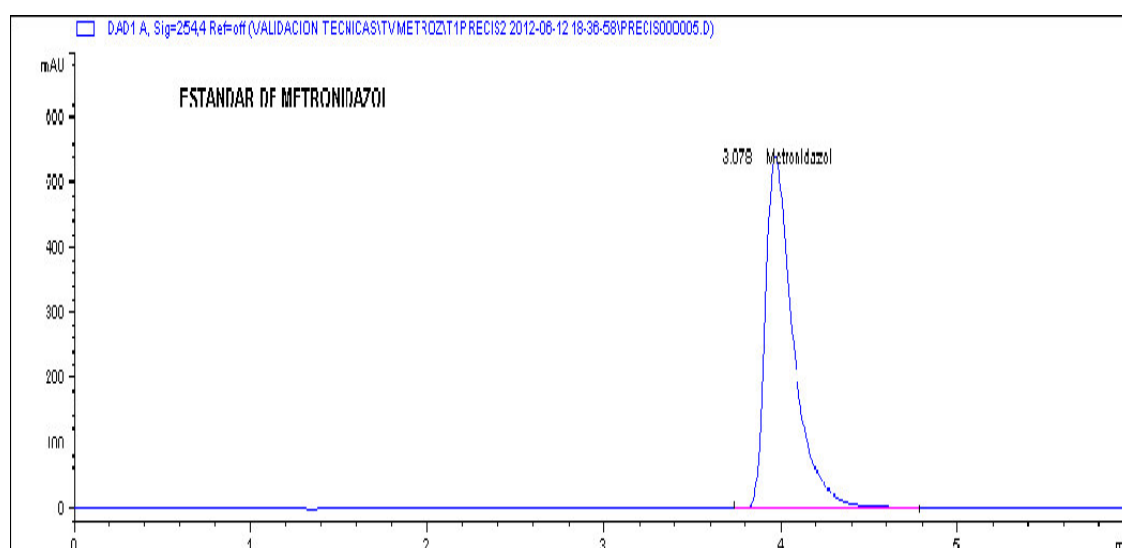
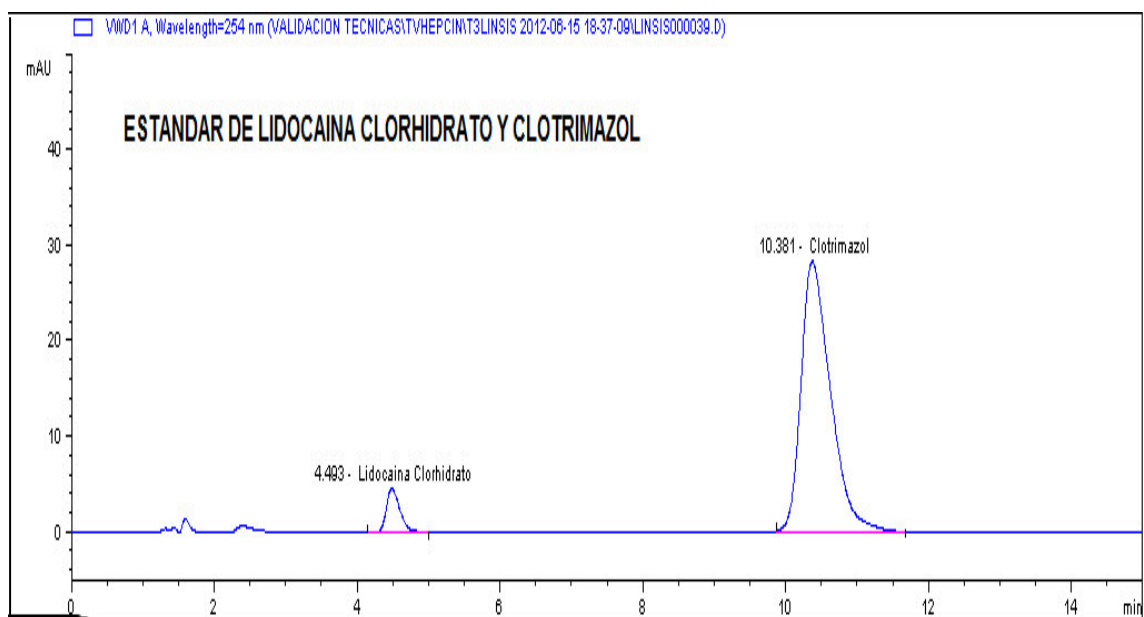
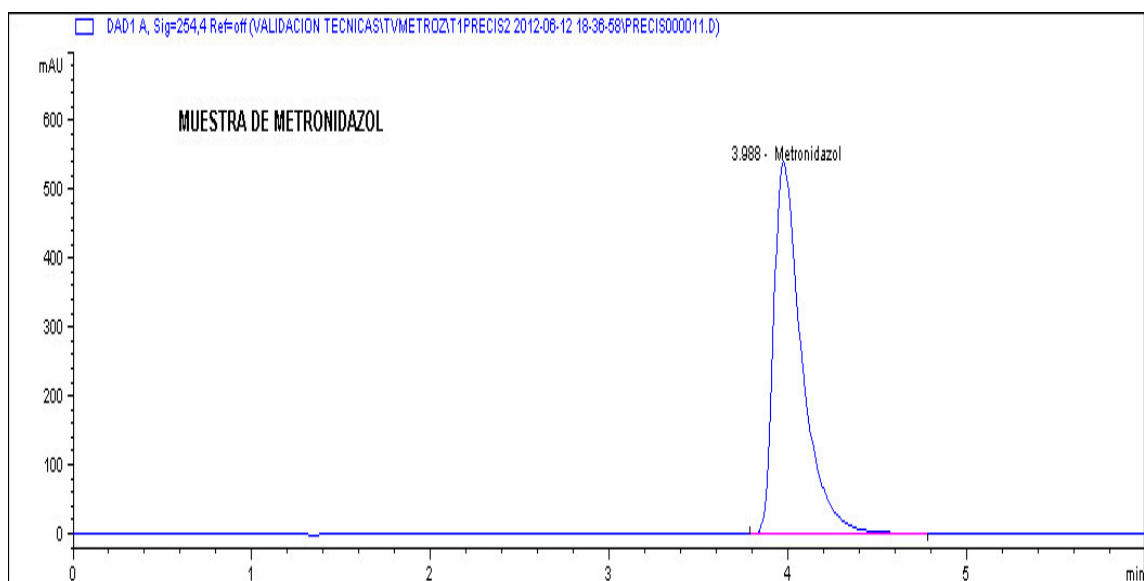


Figura N°4. Estándar de metronidazol

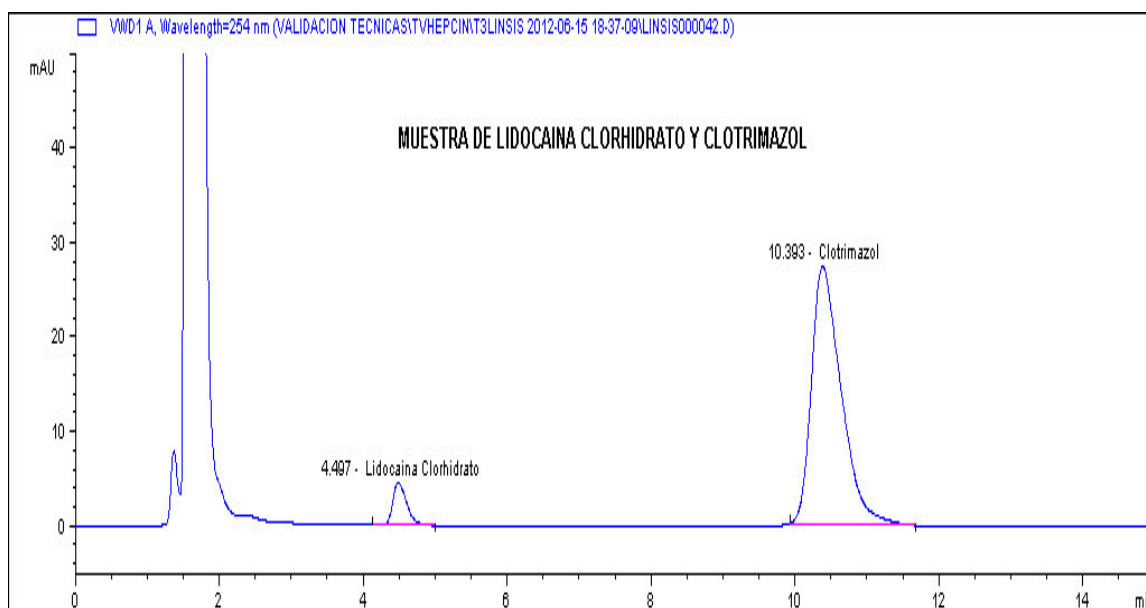


**Figura N°5.** Estándar de clorhidrato de lidocaína y clotrimazol

Se inyecta en el sistema muestras de óvulos vaginales a concentraciones similares a los estándares, observándose picos con tiempos de retención y áreas similares a los estándares, según Figura N° 6 y 7.

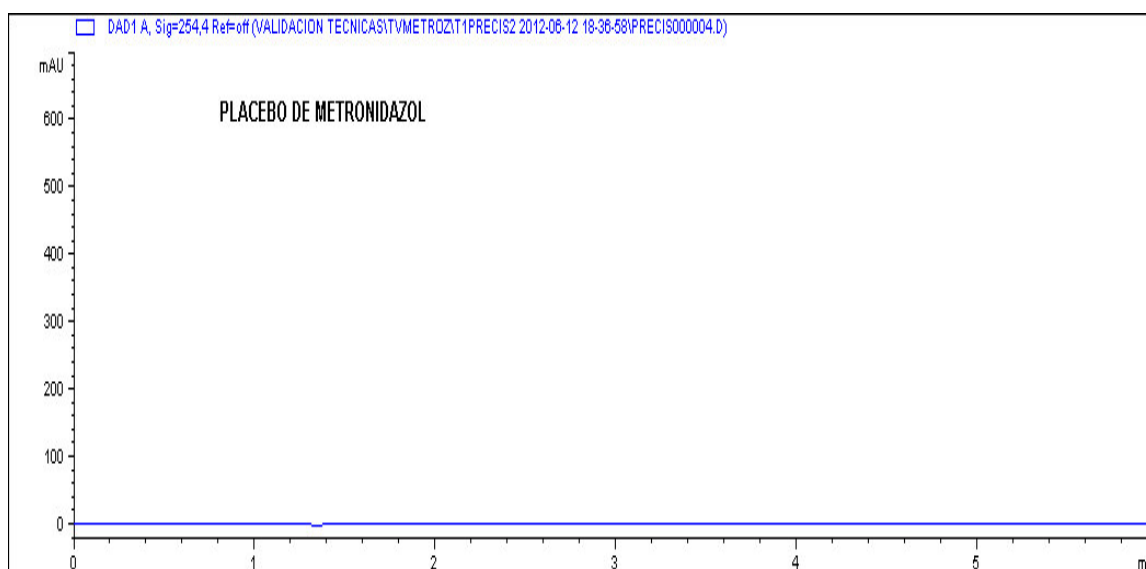


**Figura N°6.** Muestra de metronidazol en óvulos vaginales

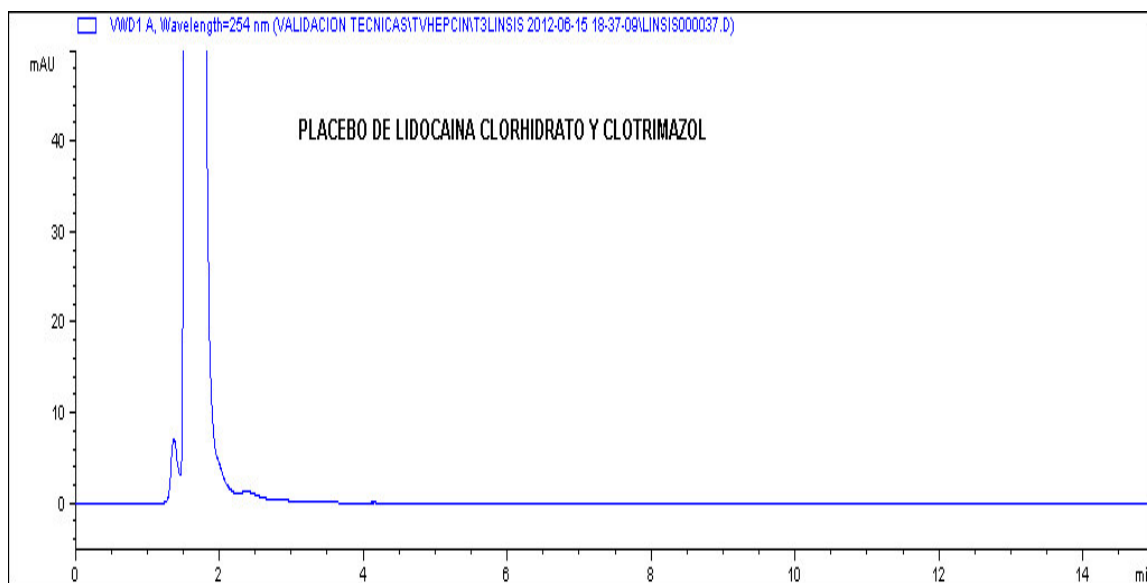


**Figura N°7.** Muestra de clorhidrato de lidocaína y clotrimazol en óvulos vaginales

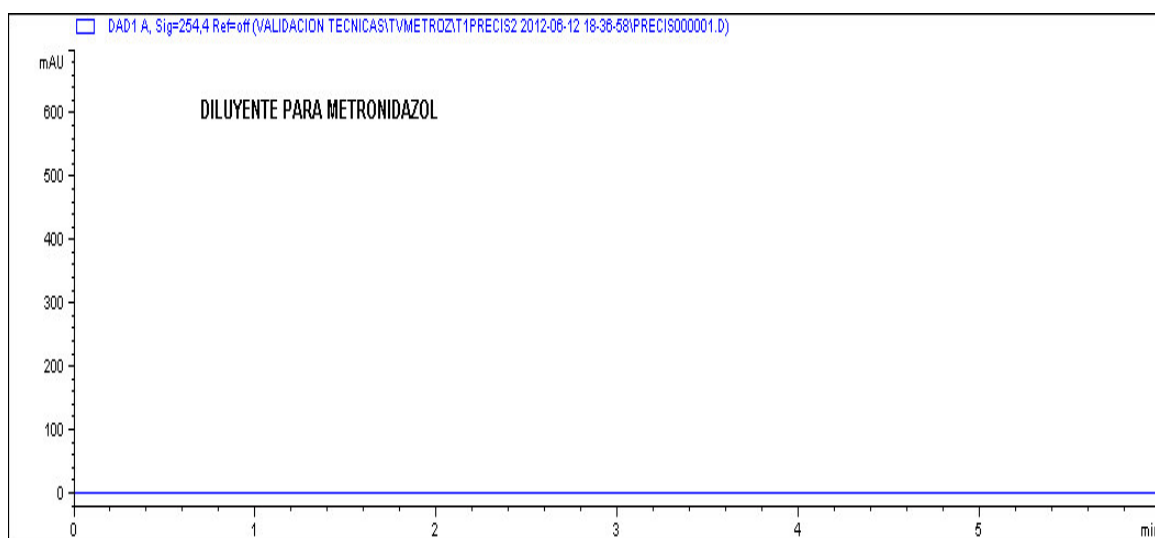
El análisis por HPLC de placebos de óvulos vaginales y medio de extracción, no detecta respuesta alguna en los mismos tiempos de retención de los principios activos a analizar, según Figura N° 8, 9, 10 y 11.



**Figura N°8.** Placebo de metronidazol en óvulos vaginales

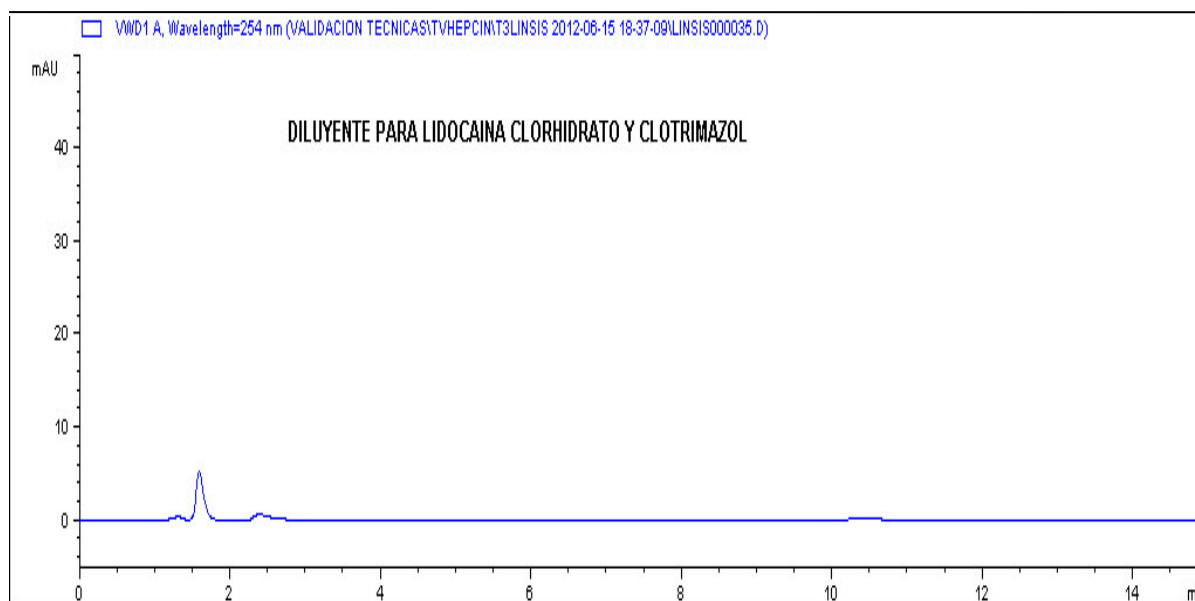


**Figura N°9.** Placebo de clorhidrato de lidocaína y clotrimazol en óvulos vaginales



**Figura N°10.** Medio de extracción del metronidazol





**Figura N°11.** Medio de extracción para clorhidrato de lidocaína y clotrimazol

También se realizó pruebas de exactitud para observar el porcentaje de recuperación de los 3 principios activos.

Para demostrar la eficacia de los resultados del método se procedió con la validación del método analítico.

### 3.7 Análisis de datos

Los datos obtenidos en la validación del método analítico fueron analizados estadísticamente por el *Microsoft Office Excel 2007*.

### 3.8 Método analítico por cromatografía de líquidos (HPLC) para metronidazol

#### Sistema Cromatográfico

La separación del metronidazol se llevo a cabo a través de una columna C8 (*Lichrosphere 100 RP-8* de 125 mm x 4.0 mm x 5 µm), utilizando como fase móvil una mezcla de agua purificada: metanol grado HPLC (80:20), a un flujo de 1.0 mL/min., longitud de onda de 254 nm, la temperatura de análisis fue

de 30°C, con un volumen de inyección de 20 µL. La fase móvil fue filtrada y desgasificada por una membrana de 0.45 µm.

#### **Preparación del estándar.-**

Pesar con exactitud 50 mg de Metronidazol, transferir a una fiola de 25 mL, adicionar 15 mL de metanol grado HPLC y llevar a ultrasonido por 5 minutos. Enfriar y diluir a volumen con metanol grado HPLC. Homogeneizar. Medir exactamente 5.0 mL de la solución anterior, transferir a una fiola de 25 mL y diluir a volumen con la fase móvil. Homogeneizar, filtrar por membrana de 0.45 µm e inyectar. (Concentración 0.4 mg/mL)

#### **Preparación de la muestra.-**

Triturar hasta obtener una masa uniforme. Pesar con exactitud 1.5 g de muestra (equivalente a 250 mg de Metronidazol), transferir a una fiola de 50 mL, adicionar 25 mL de metanol grado HPLC y llevar al ultrasonido por 20 minutos hasta disolver completamente la muestra. Agitar mecánicamente por 5 minutos, enfriar y diluir a volumen con metanol grado HPLC. Homogeneizar. Medir exactamente 4.0 mL de la solución anterior, transferir a una fiola de 50 mL y diluir a volumen con la fase móvil. Homogeneizar, filtrar por membrana de 0.45 µm e inyectar. (Concentración 0.4 mg/mL).

### **3.9 Validación del Método Analítico para Metronidazol**

#### **a) Precisión Instrumental**

Para evaluar la precisión instrumental del Metronidazol, se inyectaron 6 veces consecutivas la solución del estándar, a la concentración nominal de trabajo (0.4mg/mL), donde los resultados se muestran en la Tabla N°3.

**Tabla N°3.** Datos obtenidos de la precisión instrumental del metronidazol

Nº LECTURA	METRONIDAZOL	
	TIEMPO DE RETENCION	AREA
1	3.99259	6043.41406
2	3.99407	6047.89307
3	3.99078	6042.57617
4	3.98684	6038.82178
5	3.98620	6047.62939
6	3.98542	6048.82764
<b>Promedio</b>	<b>3.98932</b>	<b>6044.86035</b>
<b>RSD %</b>	<b>0.1%</b>	<b>0.1%</b>

#### **b) Linealidad del Sistema**

Para evaluar la Linealidad del Sistema, se preparó a partir de una solución stock 5 diluciones, que cubran el rango de trabajo, al 50%, 75%, 100%, 125% y 150% de la concentración nominal de trabajo (0.4mg/mL), se trabajó por triplicado con 3 soluciones *stock* para Metronidazol y se inyecta en el sistema en orden creciente.

- METRONIDAZOL**

Estándar: Metronidazol

Potencia: 98.9% t/c Metronidazol

**Solución Stock 1**      126.00   mg    $\longrightarrow$    25 mL

			Concentración
<b>50%</b>	2mL →	50 mL	0.1994 mg/mL
<b>75%</b>	3mL →	50 mL	0.2991 mg/mL
<b>100%</b>	4mL →	50 mL	0.3988 mg/mL
<b>125%</b>	4mL →	50 mL	0.4985 mg/mL
<b>150%</b>	6mL →	50 mL	0.5981 mg/mL

**Solución Stock 2**      125.20 mg → 25 mL

			Concentración
<b>50%</b>	2mL →	50 mL	0.1981 mg/mL
<b>75%</b>	3mL →	50 mL	0.2972 mg/mL
<b>100%</b>	4mL →	50 mL	0.3962 mg/mL
<b>125%</b>	5mL →	50 mL	0.4953 mg/mL
<b>150%</b>	6mL →	50 mL	0.5943 mg/mL

**Solución Stock 3**      125.60 mg → 25 mL

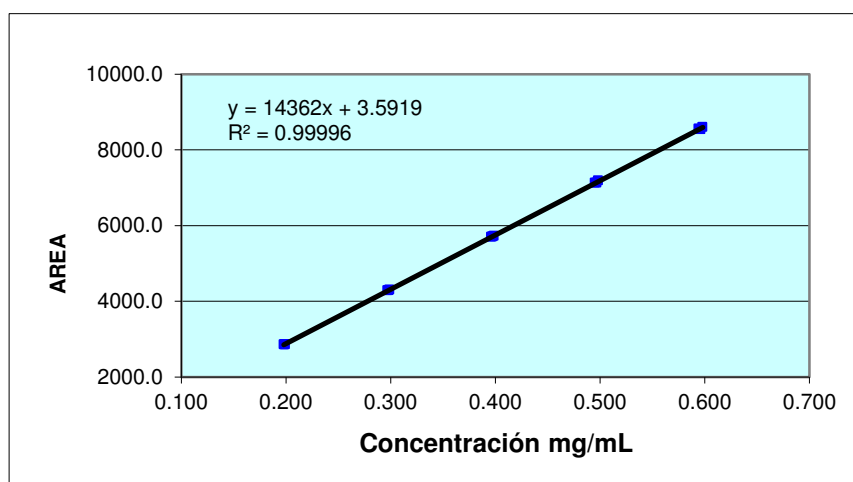
			Concentración
<b>50%</b>	2mL →	50 mL	0.1987 mg/mL
<b>75%</b>	3mL →	50 mL	0.2981 mg/mL
<b>100%</b>	4mL →	50 mL	0.3975 mg/mL
<b>125%</b>	5mL →	50 mL	0.4969 mg/mL
<b>150%</b>	6mL →	50 mL	0.5962 mg/mL

**Tabla N°4.** Datos del análisis de la regresión en la linealidad del sistema del metronidazol

Concentración	Datos (n)	x	y	f (y/x)	Varianza	RSD%
50%	1	0.1993824	2857.8780	14333.6526	831.98726	0.2008
	2	0.1981164	2851.1611	14391.3375		
	3	0.1987494	2854.6462	14363.0404		
75%	1	0.2990736	4302.1670	14384.9775	680.708714	0.1813
	2	0.2971747	4286.2023	14423.1730		
	3	0.2981241	4285.0239	14373.2864		
100%	1	0.3987648	5719.7109	14343.5703	199.833333	0.0985
	2	0.3962329	5694.5920	14371.8282		
	3	0.3974988	5706.8571	14356.9139		
125%	1	0.4984560	7186.7334	14417.9896	1570.12802	0.2755
	2	0.4952912	7128.9831	14393.5187		
	3	0.4968736	7125.4038	14340.4757		
150%	1	0.5981472	8593.8037	14367.3726	1125.86997	0.2336
	2	0.5943494	8553.4487	14391.2792		
	3	0.5962482	8541.2700	14325.0215		

Ecuación de la recta obtenida a partir de los datos del análisis de regresión en la Linealidad del Sistema del Metronidazol.

Ecuación obtenida:  $y = 14362.137x + 3.592$



**Figura N°12.** Representación gráfica de los datos obtenidos en la linealidad del sistema de metronidazol

## ANOVA del análisis de regresión

### - Homogeneidad de varianzas

Planteamiento de Hipótesis para determinar si el factor concentración tiene influencia en los resultados

$H_0$ : las varianzas son estadísticamente homogéneas

$H_1$ : las varianzas no son estadísticamente homogéneas

Criterio de aceptación:

Se evalúa a través del *Test de Cochran*, Si  $G_{\text{exp}} < G_{\text{tablas}}$  para una probabilidad del 95%, se acepta la  $H_0$ , demostrando que las varianzas no son estadísticamente diferentes entre sí. <sup>(9)</sup> <sup>(10)</sup>

$$G_{\text{exp}} = \frac{s^2 \text{ máxima}}{s^2_1 + s^2_2 + s^2_3}$$

$$G_{\text{exp}} = 0.36$$

$$G_{\text{tablas}} = 0.68$$

Resultado: Como  $G_{\text{exp}} < G_{\text{tablas}}$ , se acepta la  $H_0$ ; las varianzas son estadísticamente homogéneas.

### - Planteamiento de la Hipótesis: ANOVA

$H_0$ : El análisis de regresión SI proporciona un buen ajuste a los datos

$H_1$ : El análisis de regresión NO proporciona un buen ajuste a los datos

Criterio de aceptación:

Si  $F_{\text{exp}} > F_{\text{tablas}}$  para una probabilidad del 95% se rechaza la  $H_1$  demostrando que el análisis de regresión SI proporciona un buen ajuste a los datos. <sup>(9)</sup> <sup>(10)</sup>

**Tabla N°5.** Análisis de la Varianza de la Linealidad del Sistema del Metronidazol

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	$F_{\text{exp}}$	p-valor	$F_{\text{tablas}}$
Regresión	1	61113572.76	61113572.76	<b>350787.45</b>	3.42E-30	<b>4.667</b>
Residuos	13	2264.837135	174.2182411			
Total	14	61115837.59				

Resultado:

Como  $F_{\text{exp}} > F_{\text{tablas}}$ , se rechaza la  $H_1$ ; el análisis de regresión SI proporciona un buen ajuste a los datos. <sup>(9)</sup> <sup>(10)</sup>

- **Coefficiente de Variación de las Respuesta encontradas (f):**

$$f = \frac{y}{x}$$

De la Tabla N°6: Media de  $f = 14371.829$

**Desviación Estándar Relativa obtenida (RSD%) = 0.2%**

**c) Linealidad del Método**

Para evaluar la Linealidad del Método, se preparó soluciones de placebo enriquecidos con el principio activo en 3 niveles de concentración que cubran el intervalo de trabajo, por pesadas independientes y por triplicado:

80%, 100% y 120% de la concentración nominal de trabajo (0.4mg/mL) en el rango establecido para Metronidazol y se inyecta en el sistema en orden creciente.

- **METRONIDAZOL**

Estándar: Metronidazol

Potencia: 98.9 % t/c Metronidazol

Muestra: Estándar (principio activo en mg) + placebo

<b>80%</b>		Concentración
201.40 mg		0.3187 mg/mL
203.30 mg	→ 50 mL + Placebo	0.3217 mg/mL
202.20 mg	↓	0.3200 mg/mL
	4 mL → 50 mL	
<b>100%</b>		Concentración
250.30 mg		0.3961 mg/mL
252.20 mg	→ 50 mL + Placebo	0.3991 mg/mL
252.30 mg	↓	0.3992 mg/mL
	4 mL → 50 mL	
<b>120%</b>		Concentración
300.60 mg		0.4757 mg/mL
301.90 mg	→ 50 mL + Placebo	0.4777 mg/mL
301.60 mg	↓	0.4773 mg/mL
	4 mL → 50 mL	

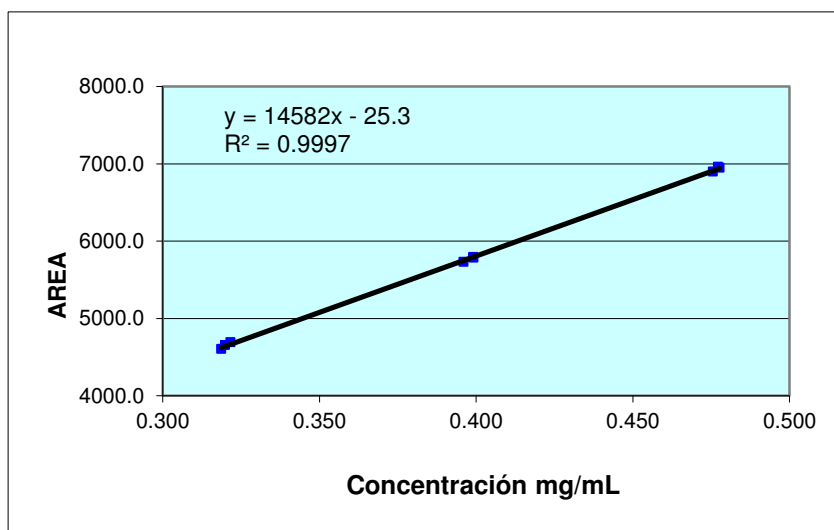


**Tabla N°6.** Análisis de regresión en la linealidad del método del metronidazol

Concentración	Datos (n)	x	y	f	Varianza	RSD
80%	1	0.3186953	4603.2517	14444.0500	5190.72813	0.49609702
	2	0.3217019	4692.1836	14585.5007		
	3	0.3199612	4651.7778	14538.5649		
100%	1	0.3960747	5730.2189	14467.5201	454.360572	0.14713643
	2	0.3990812	5790.5854	14509.7897		
	3	0.3992395	5782.5271	14483.8545		
120%	1	0.4756694	6896.9270	14499.4116	1695.76338	0.28319658
	2	0.4777265	6947.0356	14541.8661		
	3	0.4772518	6959.1706	14581.7576		

Ecuación de la recta obtenida a partir de los datos del análisis de regresión en la Linealidad del Método del Metronidazol

Ecuación obtenida:  $y = 14581.734x - 25.300$



**Figura N°13.** Representación gráfica de los datos obtenidos en la linealidad del método del metronidazol

## ANOVA del análisis de regresión

### - Homogeneidad de varianzas

Planteamiento de Hipótesis para determinar si el factor concentración tiene influencia en los resultados.

$H_0$ : las varianzas son estadísticamente homogéneas

$H_1$ : las varianzas no son estadísticamente homogéneas

Criterio de aceptación:

Se evalúa a través del *Test de Cochran*, Si  $G_{exp} < G_{tablas}$  para una probabilidad del 95%, se acepta la  $H_0$ , demostrando que las varianzas no son estadísticamente diferentes entre sí. <sup>(9) (10)</sup>

$$G_{exp} = \frac{s^2 \text{ máxima}}{s^2_1 + s^2_2 + s^2_3}$$

$$G_{exp} = 0.71$$

$$G_{tablas} = 0.87$$

Resultado: Como  $G_{exp} < G_{tablas}$ , se acepta la  $H_0$ ; las varianzas son estadísticamente homogéneas.

### - Planteamiento de la Hipótesis: ANOVA

$H_0$ : El análisis de regresión SI proporciona un buen ajuste a los datos

$H_1$ : El análisis de regresión NO proporciona un buen ajuste a los datos

Criterio de aceptación:

Si  $F_{\text{exp}} > F_{\text{tablas}}$  para una probabilidad del 95% se rechaza la  $H_1$  demostrando que el análisis de regresión SI proporciona un buen ajuste a los datos. <sup>(9)</sup> <sup>(10)</sup>

**Tabla N°7.** Análisis de la varianza de la linealidad del método del metronidazol

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	$F_{\text{exp}}$	p-valor	$F_{\text{tablas}}$
Regresión	1	7840727.641	7840727.641	<b>20705.111</b>	2.07E-13	5.591
Residuos	7	2650.799237	378.6856053			
Total	8	7843378.44				

Resultado:

Como  $F_{\text{exp}} > F_{\text{tablas}}$ , se acepta la  $H_1$ ; el análisis de regresión SI proporciona un buen ajuste a los datos.

- **Coefficiente de Variación de las Respuestas encontradas (f):**

$$f = \frac{y}{x}$$

De la Tabla N°9: Media de  $f = 14516.924$

**Desviación Estándar Relativa obtenida (RSD%) = 0.3%**

**d) Exactitud**

Se evalúa con las mismas muestras preparadas para la determinación de la linealidad del método. Simultáneamente con las muestras, analizar dos estándares a la concentración nominal de trabajo (0.4 mg/mL), para

reportar los resultados de exactitud (Porcentaje de Recuperación), según Tabla N°10.

$$\% R = \frac{X_H}{X_A} \times 100$$

Donde:

$X_H$  = Cantidad de analito hallado

$X_A$  = Cantidad del analito añadido

$\% R$  = Porcentaje de Recuperación

Peso St-1 : 51.30 mg

Peso St-2 : 52.00 mg

**Tabla N°8.** Áreas del estándar de metronidazol

	<b>Estándar 1</b>	<b>Estándar 2</b>
AREAS	5844.06836	5944.76855
	5845.35791	5946.82178
	5848.61279	5944.34180
	5846.85742	5947.68359
	5863.16016	5943.74756
	5860.73193	5945.39941
	5867.01025	5948.29736
	5876.88770	5944.01758
PROMEDIO	5856.58582	5945.63470
RSD	0.2%	0.03%

$$\text{Factor de dilución (F)} = \frac{W_{St}}{25} \times \frac{5}{25} \times \frac{50}{1} \times \frac{50}{4}$$

$$F = 258.2500$$

**Tabla N°9.** Áreas de las muestras obtenidas para la exactitud del metronidazol

MUESTRA	80%	100%	120%
M1	4602.81152	5732.27441	6898.66406
	4603.69189	5728.16357	6895.18994
M2	4693.54834	5791.87891	6947.04688
	4690.81885	5789.29199	6947.02441
M3	4653.77881	5783.38525	6960.27148
	4649.77686	5781.66895	6958.06982

$$\text{mg Hallado} = \frac{\text{Área Mta}}{\text{Área St}} \times F$$

**Tabla N°10.** Resultados de la exactitud del metronidazol

Concentración	Ensayo	Añadido (mg)	Hallado (mg)	Recuperación %
80%	1	201.40	201.45	100.03
	2	203.30	205.34	101.01
	3	202.20	203.58	100.68
100%	1	250.30	250.77	100.19
	2	252.20	253.41	100.48
	3	252.30	253.06	100.30
120%	1	300.60	301.83	100.41
	2	301.90	304.02	100.70
	3	301.60	304.55	100.98
Promedio				100.53
RSD (%)				0.3%

**e) Precisión del Método**

**- Repetibilidad**

Este parámetro se analizó y evaluó en 6 muestras de un lote, según método analítico propuesto, donde se determina la Desviación Estándar (S) y el Coeficiente de Variación (RSD), según tabla N°11. <sup>(9) (10)</sup>

**Tabla N°11.** Resultados del análisis de la repetibilidad del metronidazol

<b>Muestra Nº</b>	<b>Peso Muestra (g)</b>	<b>mg/óvulo hallados</b>	<b>%</b>
1	1.5323	509.8582	101.9716
2	1.5396	502.5682	100.5136
3	1.5406	504.9037	100.9807
4	1.5389	509.2614	101.8523
5	1.5944	503.3169	100.6634
6	1.5381	508.0506	101.6101
Promedio		506.3265	100.2653
Desviación Estándar (s)			3.139
Desviación Estándar Relativa% (RSD)			0.6

**- Precisión Intermedia**

Se realiza por un segundo analista, determinando la Desviación Estándar (S) y el Coeficiente de Variación (RSD), según Tabla N°12. <sup>(9) (10)</sup>

**Tabla N°12.** Resultados del análisis de metronidazol por otro analista

<b>Muestra Nº</b>	<b>Peso Muestra (g)</b>	<b>mg/óvulo hallados</b>	<b>%</b>
1	1.5570	491.3769	98.2754
2	1.5504	496.8985	99.3797
3	1.5845	488.6920	97.7384
4	1.5295	493.0049	98.6010
5	1.5738	495.6733	99.1347
6	1.5850	494.2189	98.8438
Promedio		493.3107	98.6621
Desviación Estándar (s)			2.98
Desviación Estándar Relativa % (RSD)			0.6

**Tabla N°13.** Comparación de resultados obtenidos de la precisión intermedia de metronidazol

<b>Nº</b>	<b>ANALISTA 1</b>	<b>ANALISTA 2</b>
1	101.97	98.28
2	100.51	99.38
3	100.98	97.74
4	101.85	98.60
5	100.66	99.13
6	101.61	98.84
Promedio	99.96 %	
RSD (%)	1.48 %	

#### **f) Robustez**

##### **Estabilidad de la muestra después de 24 horas en refrigeración:**

Se consideran las 3 primeras muestras de la repetibilidad como análisis inicial y las mismas muestras se vuelven a analizar después de 24 horas con

un estándar recién preparado, determinando la diferencia de resultados y la Desviación Estándar Relativa (RSD)

**Tabla N°14.** Resultados del análisis inicial de la repetibilidad del metronidazol

<b>Muestra N°</b>	<b>Metronidazol%</b>
M <sub>1</sub>	101.97
M <sub>2</sub>	100.51
M <sub>3</sub>	100.98

**Tabla N°15.** Resultados de las muestras de repetibilidad después de 24 horas en refrigeración

<b>Muestra N°</b>	<b>Peso Muestra (g)</b>	<b>mg/óvulo hallados</b>	<b>%</b>
1	1.5323	501.5982	100.3196
2	1.5396	494.2957	98.8591
3	1.5406	497.5613	99.5123

**Tabla N°16.** Resultados de la estabilidad de las muestras de repetibilidad después de 24 horas en refrigeración

<b>MUESTRA</b>	<b>DOSAJE (%)</b>		<b>DIFERENCIA</b>
	<b>INICIO</b>	<b>FINAL</b>	
M1	101.9716	100.3196	1.65
M2	100.5136	98.8591	1.65
M3	100.9807	99.5123	1.47
PROMEDIO	101.16	99.56	<b>1.6%</b>
	y <sub>0</sub>	y <sub>1</sub>	<b>Id<sub>1</sub>l</b>
<b>RSD</b>	<b>1.1%</b>		



**g) Especificidad – Degradaciones**

**Determinación de interferencia de productos de degradación:**

Se analiza el placebo, el principio activo y muestras con los siguientes métodos de degradación artificial:

- a) Hidrólisis ácida, por calentamiento en baño maría con HCl 0.1N por 2 horas y posterior neutralización con NaOH 0.1 N.
- b) Hidrólisis alcalina, por calentamiento en baño maría con NaOH 0.1N por 2 horas y posterior neutralización con HCl 0.1N.
- c) Oxidación, por 2 horas en baño maría con 5 gotas de Peróxido de Hidrógeno al 30%.
- d) Termólisis, por calentamiento de la droga en estufa a 80°C por 15 horas
- e) Fotólisis, exposición en lámpara de luz UV por 5 días.

**Tabla N°17.** Resultados de la degradación de la hidrólisis ácida del metronidazol

<b>HIDROLISIS ACIDA</b>			
MUESTRA	PLACEBO (%)	PRINCIPIO ACTIVO (%)	MUESTRA (%)
M <sub>1</sub>	0.00	97.01	99.19
M <sub>2</sub>	0.00	96.84	99.11
PROMEDIO	0.00	<b>96.93</b>	<b>99.15</b>
RSD	0.0%	0.1%	0.1%

**Tabla N°18.** Resultados de la degradación de la hidrólisis alcalina de metronidazol

<b>HIDROLISIS ALCALINA</b>			
MUESTRA	PLACEBO (%)	PRINCIPIO ACTIVO (%)	MUESTRA (%)
M <sub>1</sub>	0.00	79.26	86.79
M <sub>2</sub>	0.00	79.58	85.13
PROMEDIO	0.00	<b>79.42</b>	<b>85.96</b>
RSD	0.0%	0.3%	1.4%

**Tabla N°19.** Resultados de la degradación de la oxidación de metronidazol

<b>OXIDACION</b>			
MUESTRA	PLACEBO (%)	PRINCIPIO ACTIVO (%)	MUESTRA (%)
M <sub>1</sub>	0.00	93.03	98.78
M <sub>2</sub>	0.00	93.09	99.69
PROMEDIO	0.00	<b>93.06</b>	<b>99.24</b>
RSD	0.0%	0.05%	0.6%

**Tabla N°20.** Resultados de la degradación de la termólisis de metronidazol

<b>TERMOLISIS</b>			
MUESTRA	PLACEBO (%)	P.A (%)	MUESTRA (%)
M <sub>1</sub>	0.00	99.64	99.63
M <sub>2</sub>	0.00	99.51	99.78
PROMEDIO	0.00	<b>99.58</b>	<b>99.70</b>
RSD	0.0%	0.1%	0.1%

**Tabla N°21.** Resultados de la degradación de la fotólisis UV de metronidazol

<b>FOTOLISIS</b>			
MUESTRA	PLACEBO (%)	P.A (%)	MUESTRA (%)
M <sub>1</sub>	0.00	99.84	99.95
M <sub>2</sub>	0.00	99.98	99.90
PROMEDIO	0.00	<b>99.91</b>	<b>99.93</b>
RSD	0.0%	0.1%	0.03%

### 3.10 Método analítico por cromatografía de líquidos (HPLC) para clorhidrato de lidocaína y clotrimazol

#### Sistema cromatográfico

La separación del clorhidrato de lidocaína y clotrimazol se llevo a cabo a través de una columna C18 (*Zorbax* XDB de 150 mm x 4.6 mm x 5 µm), utilizando como fase móvil una mezcla de *buffer* fosfato: metanol grado HPLC (25:75), a un flujo de 1.0 mL/min., longitud de onda de 254 nm, la temperatura de análisis fue de 30°C, con un volumen de inyección de 50 µL. La fase móvil fue filtrada y desgasificada por una membrana de 0.45 µm.

#### Preparación del estándar.-

##### -Solución estándar A.-

Pesar con exactitud 15 mg de ER Lidocaína Clorhidrato, transferir a una fiola de 100 mL, adicionar 20 mL de metanol grado HPLC y llevar al ultrasonido por 2 minutos, diluir a volumen con metanol grado HPLC. Homogeneizar.

### **-Solución estándar B.-**

Pesar con exactitud 50 mg de ER Clotrimazol, transferir a una fiola de 25 mL, adicionar 15 mL de metanol grado HPLC y llevar al ultrasonido por 2 minutos, diluir a volumen con metanol grado HPLC. Homogeneizar.

Medir exactamente 4.0 mL de la solución estándar A y 4.0 mL de solución estándar B, transferir a una fiola de 50 mL, diluir a volumen con fase móvil. Homogeneizar, filtrar por membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  e inyectar. (Con.: 0.012 mg/mL para Lidocaína Clorhidrato y 0.16 mg/mL para Clotrimazol)

### **Preparación de la muestra.-**

Triturar, no menos de 10 óvulos hasta obtener una masa uniforme. Pesar con exactitud 1.5 g de muestra (equivalente a 3.5 mg de Lidocaína Clorhidrato y 50 mg de Clotrimazol) transferir a una fiola de 50 mL, adicionar 15 mL de metanol grado HPLC y llevar al ultrasonido por 20 minutos hasta disolver completamente la muestra. Agitar mecánicamente por 5 minutos, enfriar y diluir a volumen con metanol grado HPLC. Homogeneizar. Medir exactamente 4.0 mL de la solución anterior, transferir a una fiola de 25 mL y diluir a volumen con fase móvil. Homogeneizar, filtrar por membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  e inyectar. (Con.: 0.012 mg/mL para Lidocaína Clorhidrato y 0.16 mg/mL para Clotrimazol)

### 3.11 Validación del Método Analítico para Clorhidrato de Lidocaína y Clotrimazol

#### a) Precisión Instrumental

Para evaluar la precisión instrumental del Clotrimazol y Clorhidrato de Lidocaína, se inyectaron 6 veces consecutivas una solución del estándar, a la concentración nominal de trabajo (0.012 mg/mL para Lidocaína Clorhidrato y 0.16 mg/mL para Clotrimazol), donde los resultados se muestran en la Tabla N°22.

**Tabla N°22.** Datos obtenidos de la precisión instrumental del clorhidrato de lidocaína y clotrimazol

Nº LECTURA	CLORHIDRATO DE LIDOCAINA		CLOTRIMAZOL	
	TIEMPO DE RETENCION	AREA	TIEMPO DE RETENCION	AREA
1	4.50648	60.24380	10.40604	818.62250
2	4.50204	60.11103	10.40742	817.53076
3	4.49842	60.79509	10.41316	817.75092
4	4.49785	60.93557	10.41676	817.96619
5	4.49366	60.92402	10.42250	817.36078
6	4.50028	60.85329	10.43127	817.13385
<b>PROM</b>	<b>4.49979</b>	<b>60.64380</b>	<b>10.41619</b>	<b>817.72750</b>
<b>RSD %</b>	<b>0.1%</b>	<b>0.6%</b>	<b>0.1%</b>	<b>0.1%</b>

#### b) Linealidad del Sistema

Para evaluar la Linealidad del Sistema, se preparó a partir de una solución stock 5 diluciones, que cubran el rango de trabajo, al 50%, 75%, 100%, 125% y 150% de la concentración nominal de trabajo (0.012 mg/mL para Lidocaína Clorhidrato y 0.16 mg/mL para Clotrimazol), se trabajó por

triplicado con 3 soluciones *stock* para Clorhidrato de Lidocaína y Clotrimazol y se Inyecta en el sistema en orden creciente.

- **CLORHIDRATO DE LIDOCAINA**

Estándar: Clorhidrato de Lidocaína

Potencia: 93.75 %t/c Clorhidrato de Lidocaína

**Solución Stock 1**                      16.30 mg → 100 mL

Concentración

<b>50%</b>	2mL →	50 mL	0.0061 mg/mL
<b>75%</b>	3mL →	50 mL	0.0092 mg/mL
<b>100%</b>	4mL →	50 mL	0.0122 mg/mL
<b>125%</b>	5mL →	50 mL	0.0153 mg/mL
<b>150%</b>	6mL →	50 mL	0.0183 mg/mL

**Solución Stock 2**                      16.80 mg → 100 mL

Concentración

<b>50%</b>	2mL →	50 mL	0.0063 mg/mL
<b>75%</b>	3mL →	50 mL	0.0095 mg/mL
<b>100%</b>	4mL →	50 mL	0.0126 mg/mL
<b>125%</b>	5mL →	50 mL	0.0158 mg/mL
<b>150%</b>	6mL →	50 mL	0.0189 mg/mL

**Solución Stock 3**

15.60 mg → 100 mL

**Concentración**

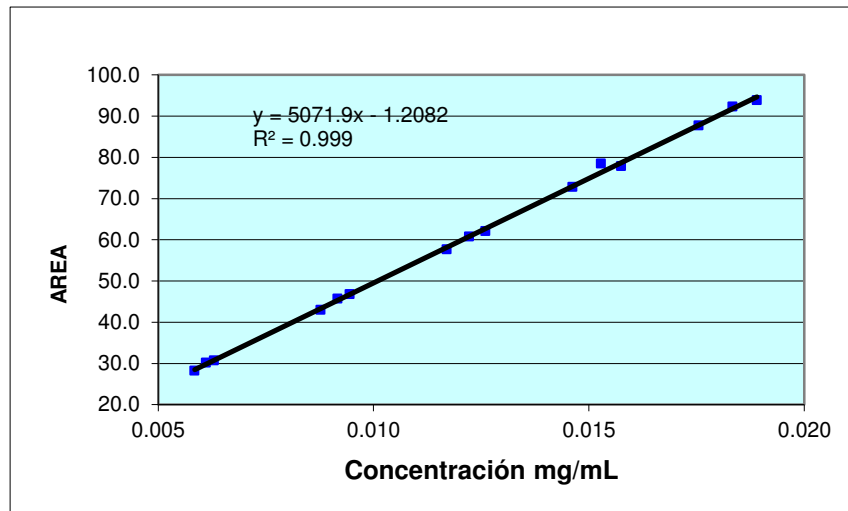
<b>50%</b>	2mL → 50 mL	0.0059 mg/mL
<b>75%</b>	3mL → 50 mL	0.0088 mg/mL
<b>100%</b>	4mL → 50 mL	0.0117 mg/mL
<b>125%</b>	5mL → 50 mL	0.0146 mg/mL
<b>150%</b>	6mL → 50 mL	0.0176 mg/mL

**Tabla N°23.** Datos del análisis de la regresión en la linealidad del sistema de clorhidrato de lidocaína

<b>Concentración</b>	<b>Dato (n)</b>	<b>x</b>	<b>y</b>	<b>f (y/x)</b>	<b>Varianza</b>	<b>RSD%</b>
50%	1	0.0061	30.1328	4929.70470	2526.32643	1.03037377
	2	0.0063	30.7142	4875.27143		
	3	0.0058	28.2513	4829.29829		
75%	1	0.0091	45.6979	4984.10198	1707.39962	0.83563523
	2	0.0094	46.7646	4948.64444		
	3	0.0087	43.0126	4901.72593		
100%	1	0.0122	60.7682	4970.81718	643.248624	0.51324111
	2	0.0126	62.0575	4925.20437		
	3	0.0117	57.6668	4928.79231		
125%	1	0.0152	78.4667	5134.83550	10244.7389	2.01631563
	2	0.0157	77.8709	4944.18825		
	3	0.0146	72.8408	4980.56752		
150%	1	0.0183	92.3118	5034.04990	1125.93836	0.67118553
	2	0.0189	93.8775	4967.06772		
	3	0.0175	87.6968	4996.97322		

Ecuación de la recta obtenida a partir de los datos del análisis de regresión en la Linealidad del Sistema del Clorhidrato de Lidocaína

Ecuación obtenida:  $y = 5071.889x - 1.208$



**Figura N°14.** Representación gráfica de la linealidad del sistema del clorhidrato de lidocaína

## ANOVA del análisis de regresión

### - Homogeneidad de varianzas

Planteamiento de Hipótesis para determinar si el factor concentración tiene influencia en los resultados

$H_0$ : las varianzas son estadísticamente homogéneas

$H_1$ : las varianzas no son estadísticamente homogéneas

Criterio de aceptación:

Se evalúa a través del *Test de Cochran*, Si  $G_{exp} < G_{tablas}$  para una probabilidad del 95%, se acepta la  $H_0$ , demostrando que las varianzas no son estadísticamente diferentes entre sí. <sup>(9) (10)</sup>

$$G_{exp} = \frac{s^2 \text{ máxima}}{s^2_1 + s^2_2 + s^2_3}$$

$$G_{exp} = 0.63$$

$$G_{tablas} = 0.68$$



Resultado: Como  $G_{\text{exp}} < G_{\text{tablas}}$ , se acepta la  $H_0$ ; las varianzas son estadísticamente homogéneas.

- **Planteamiento de la Hipótesis: ANOVA**

$H_0$ : El análisis de regresión SI proporciona un buen ajuste a los datos

$H_1$ : El análisis de regresión NO proporciona un buen ajuste a los datos

Criterio de aceptación:

Si  $F_{\text{exp}} > F_{\text{tablas}}$  para una probabilidad del 95% se rechaza la  $H_1$  demostrando que el análisis de regresión SI proporciona un buen ajuste a los datos. <sup>(9)</sup> <sup>(10)</sup>

**Tabla N°24.** Análisis de la varianza de la linealidad del sistema del clorhidrato de lidocaína

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	$F_{\text{exp}}$	p-valor	$F_{\text{tablas}}$
Regresión	1	7208.695629	7208.695629	<b>12876.984</b>	7.26E-21	<b>4.667</b>
Residuos	13	7.277561782	0.559812445			
Total	14	7215.97319				

Resultado:

Como  $F_{\text{exp}} > F_{\text{tablas}}$ , se rechaza la  $H_1$ ; el análisis de regresión SI proporciona un buen ajuste a los datos. <sup>(9)</sup> <sup>(10)</sup>

- **Coefficiente de Variación de las Respuestas encontradas (f):**

$$f = \frac{y}{x}$$

De la Tabla N°26: Media de  $f = 4956.750$

**Desviación Estándar Relativa obtenida (RSD%) = 1.4 %**

- **CLOTRIMAZOL**

Estándar: Clotrimazol

Potencia: 99.60 %t/c Clotrimazol

**Solución Stock 1**                      51.40 mg → 25 mL

Concentración

<b>50%</b>	2mL →	50 mL	0.0819 mg/mL
<b>75%</b>	3mL →	50 mL	0.1229 mg/mL
<b>100%</b>	4mL →	50 mL	0.1638 mg/mL
<b>125%</b>	5mL →	50 mL	0.2048 mg/mL
<b>150%</b>	6mL →	50 mL	0.2457 mg/mL

**Solución Stock 2**                      51.20 mg → 25 mL

Concentración

<b>50%</b>	2mL →	50 mL	0.0816 mg/mL
<b>75%</b>	3mL →	50 mL	0.1224 mg/mL
<b>100%</b>	4mL →	50 mL	0.1632 mg/mL
<b>125%</b>	5mL →	50 mL	0.2040 mg/mL
<b>150%</b>	6mL →	50 mL	0.2448 mg/mL

**Solución Stock 3**

51.00 mg → 25 mL

**Concentración**

<b>50%</b>	2mL → 50 mL	0.0813 mg/mL
<b>75%</b>	3mL → 50 mL	0.1219 mg/mL
<b>100%</b>	4mL → 50 mL	0.1625 mg/mL
<b>125%</b>	5mL → 50 mL	0.2032 mg/mL
<b>150%</b>	6mL → 50 mL	0.2438 mg/mL

**Tabla N°25.** Datos del análisis de la regresión en la linealidad del sistema de clotrimazol

<b>Concentración</b>	<b>Dato (n)</b>	<b>x</b>	<b>y</b>	<b>f (y/x)</b>	<b>Varianza</b>	<b>RSD %</b>
50%	1	0.08191104	425.211015	5191.13193	506.585544	0.43541824
	2	0.08159232	421.84767	5170.18844		
	3	0.0812736	418.246335	5146.15244		
75%	1	0.12286656	627.198915	5104.71617	953.189794	0.60122669
	2	0.12238848	632.31323	5166.44401		
	3	0.1219104	625.915985	5134.22961		
100%	1	0.16382208	838.15613	5116.25863	205.10624	0.27922928
	2	0.16318464	839.499695	5144.47742		
	3	0.1625472	833.235535	5126.11435		
125%	1	0.2047776	1067.78742	5214.37606	2946.01606	1.05354723
	2	0.2039808	1045.27295	5124.3693		
	3	0.203184	1039.65528	5116.81665		
150%	1	0.24573312	1254.73175	5106.07504	484.180763	0.42939683
	2	0.24477696	1260.31208	5148.81823		
	3	0.2438208	1247.96613	5118.37433		

Ecuación de la recta obtenida a partir de los datos del análisis de regresión en la Linealidad del Sistema del Clotrimazol

Ecuación obtenida:  $y = 5117.294x + 3.426$

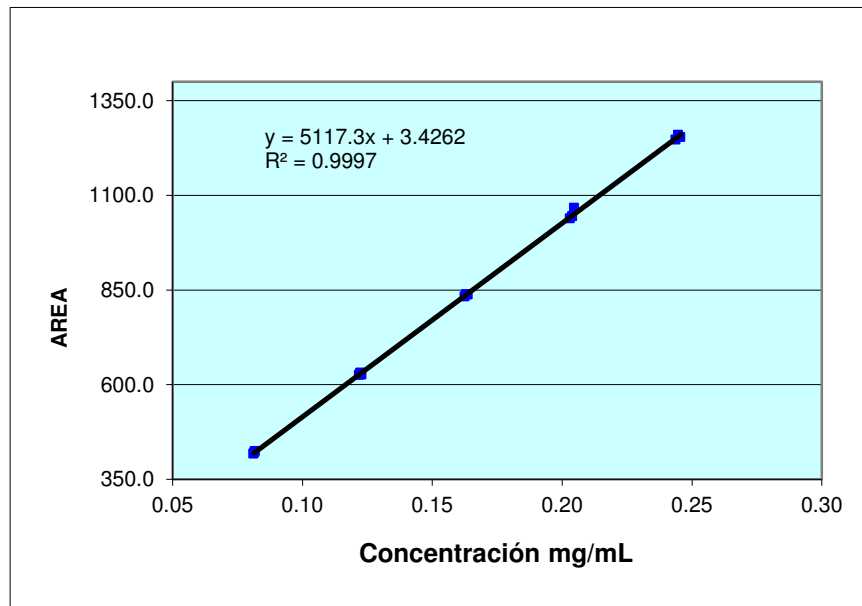


Figura N°15. Representación gráfica de la linealidad del sistema de clotrimazol

### ANOVA del análisis de regresión

#### - Homogeneidad de varianzas

Planteamiento de Hipótesis para determinar si el factor concentración tiene influencia en los resultados

$H_0$ : las varianzas son estadísticamente homogéneas

$H_1$ : las varianzas no son estadísticamente homogéneas

Criterio de aceptación:

Se evalúa a través del *Test de Cochran*, si  $G_{exp} < G_{tablas}$  para una probabilidad del 95%, se acepta la  $H_0$ , demostrando que las varianzas no son estadísticamente diferentes entre sí. <sup>(9)</sup> <sup>(10)</sup>

$$G_{\text{exp}} = \frac{s^2 \text{ máxima}}{s^2_1 + s^2_2 + s^2_3}$$

$$G_{\text{exp}} = 0.58$$

$$G_{\text{tablas}} = 0.68$$

Resultado: Como  $G_{\text{exp}} < G_{\text{tablas}}$ , se acepta la  $H_0$ ; las varianzas son homogéneas.

#### - Planteamiento de la Hipótesis: ANOVA

$H_0$ : El análisis de regresión SI proporciona un buen ajuste a los datos

$H_1$ : El análisis de regresión NO proporciona un buen ajuste a los datos

Criterio de aceptación:

Si  $F_{\text{exp}} > F_{\text{tablas}}$  para una probabilidad del 95% se rechaza la  $H_1$  demostrando que el análisis de regresión SI proporciona un buen ajuste a los datos. <sup>(9) (10)</sup>

**Tabla N°26.** Análisis de la varianza de la linealidad del sistema del clotrimazol

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	$F_{\text{exp}}$	p-valor	$F_{\text{tablas}}$
Regresión	1	1307616.291	1307616.291	<b>41085.46</b>	3.87E-24	<b>4.667</b>
Residuos	13	413.7476331	31.82674101			
Total	14	1308030.039				

Resultado:

Como  $F_{\text{exp}} > F_{\text{tablas}}$ , se rechaza la  $H_1$ ; el análisis de regresión SI proporciona un buen ajuste a los datos. <sup>(9) (10)</sup>

- **Coefficiente de Variación de las Respuestas encontradas (f):**

$$f = \frac{s}{x}$$

De la Tabla N°29: Media de f = 5141.903

**Desviación Estándar Relativa obtenida (RSD%) = 0.6%**

### c) **Linealidad del Método**

Para evaluar la Linealidad del Método, se preparó soluciones de placebo enriquecidos con el principio activo en 3 niveles de concentración que cubran el intervalo de trabajo, por pesadas independientes y por triplicado: 80%, 100% y 120% de la concentración nominal de trabajo (0.012 mg/mL para Clorhidrato de Lidocaína y 0.16 mg/mL para Clotrimazol) en el rango establecido y se inyecta en el sistema en orden creciente.

- **CLORHIDRATO DE LIDOCAINA**

Estándar: Clorhidrato de Lidocaína

Potencia: 93.75 % t/c Clorhidrato de Lidocaína

Muestra: Estándar (principio activo en mg) + placebo

**80%**

			Concentración
15.80	mg		0.0095 mg/mL
15.40	mg	→ 25 mL	0.0092 mg/mL
16.20	mg	↓	0.0097 mg/mL
5 mL → 50 mL + placebo			
↓			
4 mL → 25 mL			

**100%**

			Concentración
18.20	mg		0.0109 mg/mL
18.90	mg	→ 25 mL	0.0113 mg/mL
19.20	mg	↓	0.0115 mg/mL
5 mL → 50 mL + placebo			
↓			
4 mL → 25 mL			

**120%**

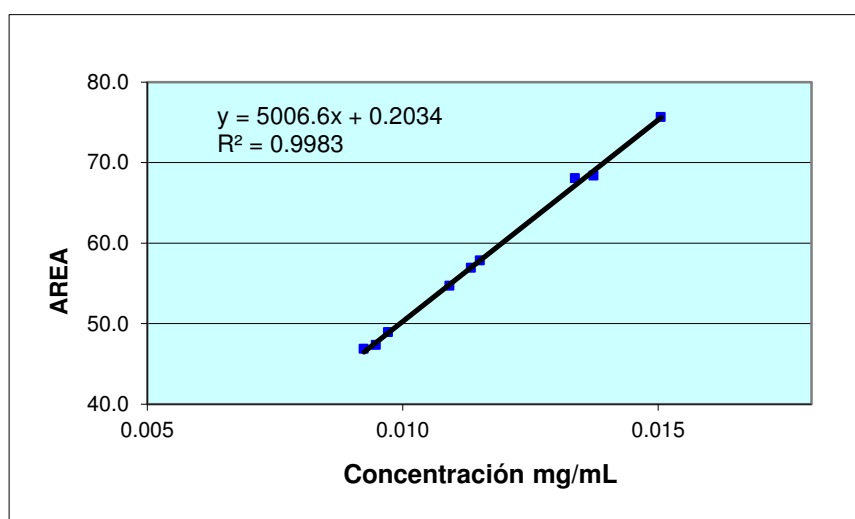
			Concentración
22.90	mg		0.0137 mg/mL
25.10	mg	→ 25 mL	0.0151 mg/mL
22.30	mg	↓	0.0134 mg/mL
5 mL → 50 mL + placebo			
↓			
4 mL → 25 mL			

**Tabla N°27.** Datos del análisis de regresión en la linealidad del método del clorhidrato de lidocaína

Concentración	Dato (n)	x	y	f (y/x)	Varianza	RSD
80%	1	0.00948	47.337395	4993.39609	1436.03205	0.7530625
	2	0.00924	46.83874	5069.12770		
	3	0.00972	48.92891	5033.83848		
100%	1	0.01092	54.6939	5008.59890	32.7904828	0.11418154
	2	0.01134	56.894955	5017.19179		
	3	0.01152	57.82409	5019.45226		
120%	1	0.01374	68.34344	4974.04949	3123.24761	1.11178523
	2	0.01506	75.6116	5020.69057		
	3	0.01338	68.04181	5085.33707		

Ecuación de la recta obtenida a partir de los datos del análisis de regresión en la Linealidad del Método del Clorhidrato de Lidocaína

Ecuación obtenida:  $y = 5006.56x - 25.300$



**Figura N°16.** Representación gráfica de la linealidad del método del clorhidrato de lidocaína



## ANOVA del análisis de regresión

### - Homogeneidad de varianzas

Planteamiento de Hipótesis para determinar si el factor concentración tiene influencia en los resultados.

$H_0$ : las varianzas son estadísticamente homogéneas

$H_1$ : las varianzas no son estadísticamente homogéneas

Criterio de aceptación:

Se evalúa a través del *Test de Cochran*, si  $G_{exp} < G_{tablas}$  para una probabilidad del 95%, se acepta la  $H_0$ , demostrando que las varianzas no son estadísticamente diferentes entre sí. <sup>(9)</sup> <sup>(10)</sup>

$$G_{exp} = \frac{s^2 \text{ máxima}}{s^2_1 + s^2_2 + s^2_3}$$

$$G_{exp} = 0.68$$

$$G_{tablas} = 0.87$$

Resultado: Como  $G_{exp} < G_{tablas}$ , se acepta la  $H_0$ ; las varianzas son estadísticamente homogéneas.

### - Planteamiento de la Hipótesis: ANOVA

$H_0$ : El análisis de regresión SI proporciona un buen ajuste a los datos

$H_1$ : El análisis de regresión NO proporciona un buen ajuste a los datos

Criterio de aceptación:

Si  $F_{\text{exp}} > F_{\text{tablas}}$  para una probabilidad del 95% se rechaza la  $H_1$  demostrando que el análisis de regresión SI proporciona un buen ajuste a los datos. <sup>(9)</sup> <sup>(10)</sup>

**Tabla N°28.** Análisis de la varianza de la linealidad del método del clorhidrato de lidocaína

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	$F_{\text{exp}}$	p-valor	$F_{\text{tablas}}$
Regresión	1	848.5814287	848.5814287	<b>4122.4105</b>	5.84E-11	<b>5.591</b>
Residuos	7	1.440921535	0.205845934			
Total	8	850.0223503				

Resultado:

Como  $F_{\text{exp}} > F_{\text{tablas}}$ , se rechaza la  $H_1$ ; el análisis de regresión SI proporciona un buen ajuste a los datos. <sup>(9)</sup> <sup>(10)</sup>

- **Coefficiente de Variación de las Respuestas encontradas (f):**

$$f = \frac{y}{x}$$

De la Tabla N°32: Media de  $f = 5024.361$

**Desviación estándar relativa obtenida (RSD%) = 0.7%**

- **CLOTRIMAZOL**

Estándar: Clotrimazol

Potencia: 99.6 % t/c Clotrimazol

Muestra: Estándar (principio activo en mg) + placebo

**80%**

40.60 mg  
42.00 mg → 50 mL + Placebo  
40.70 mg ↓  
4 mL → 25 mL

Concentración

0.1294 mg/mL  
0.1339 mg/mL  
0.1297 mg/mL

**100%**

51.70 mg  
53.50 mg → 50 mL + Placebo  
50.00 mg ↓  
4 mL → 25 mL

Concentración

0.1648 mg/mL  
0.1705 mg/mL  
0.1594 mg/mL

**120%**

60.00 mg  
62.10 mg → 50 mL + Placebo  
63.00 mg ↓  
4 mL → 25 mL

Concentración

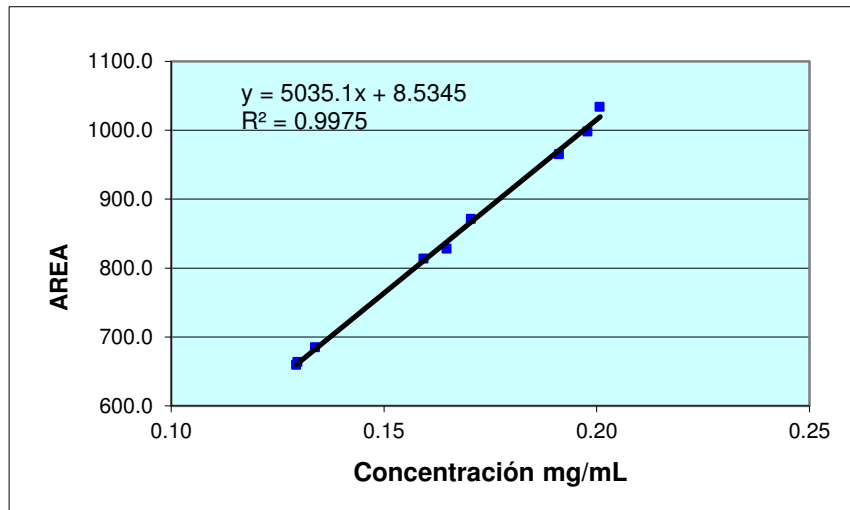
0.1912 mg/mL  
0.1979 mg/mL  
0.2008 mg/mL

**Tabla N°29.** Datos del análisis de regresión en la linealidad del método del clotrimazol

Concentración	Dato (n)	x	y	f (y/x)	Varianza	RSD
80%	1	0.12940	659.117185	5093.62871	166.031578	0.25224096
	2	0.13386	685.057705	5117.62605		
	3	0.12972	663.352445	5113.76314		
100%	1	0.16478	828.137235	5025.76818	2186.43202	0.92052013
	2	0.17052	871.24045	5109.45916		
	3	0.15936	813.33432	5103.75452		
120%	1	0.19123	965.072725	5046.60687	3586.6416	1.17931425
	2	0.19792	997.706665	5040.82890		
	3	0.20079	1033.55036	5147.32718		

Ecuación de la recta obtenida a partir de los datos del análisis de regresión en la Linealidad del Método del Clotrimazol

Ecuación obtenida:  $y = 5035.08x + 8.534$



**Figura N°17.** Representación gráfica de la linealidad del método del clotrimazol

### **Análisis de varianza: ANOVA**

#### **- Homogeneidad de varianzas**

Planteamiento de Hipótesis para determinar si el factor concentración tiene influencia en los resultados.

$H_0$ : las varianzas son estadísticamente homogéneas

$H_1$ : las varianzas no son estadísticamente homogéneas

Criterio de aceptación:

Se evalúa a través del *Test de Cochran*, si  $G_{exp} < G_{tablas}$  para una probabilidad del 95%, se acepta la  $H_0$ , demostrando que las varianzas no son estadísticamente diferentes entre sí. <sup>(9)</sup> <sup>(10)</sup>

$$G_{\text{exp}} = \frac{s^2 \text{ máxima}}{s^2_1 + s^2_2 + s^2_3}$$

$$G_{\text{exp}} = 0.60$$

$$G_{\text{tablas}} = 0.87$$

Resultado: Como  $G_{\text{exp}} < G_{\text{tablas}}$ , se acepta la  $H_0$ ; las varianzas son homogéneas.

#### - Planteamiento de la Hipótesis: ANOVA

$H_0$ : El análisis de regresión SI proporciona un buen ajuste a los datos

$H_1$ : El análisis de regresión NO proporciona un buen ajuste a los datos

Criterio de aceptación:

Si  $F_{\text{exp}} > F_{\text{tablas}}$  para una probabilidad del 95% se rechaza la  $H_1$  demostrando que el análisis de regresión SI proporciona un buen ajuste a los datos. <sup>(9) (10)</sup>

**Tabla N°30.** Análisis de la varianza de la linealidad del método del clotrimazol

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	$F_{\text{exp}}$	p-valor	$F_{\text{tablas}}$
Regresión	1	167099.2198	167099.2198	<b>2750.0757</b>	2.40E-10	5.591
Residuos	7	425.3317614	60.7616802			
Total	8	167524.5516				

Resultado:

Como  $F_{\text{exp}} > F_{\text{tablas}}$ , se rechaza la  $H_1$ ; el análisis de regresión SI proporciona un buen ajuste a los datos. <sup>(9) (10)</sup>

- **Coefficiente de Variación de las Respuestas encontradas (f):**

$$f = \frac{s}{x}$$

De la Tabla N°35: Media de f = 5088.751

**Desviación Estándar Relativa (RSD%) = 0.8%**

#### **d) Exactitud**

Se evalúa con las mismas muestras preparadas para la determinación de la linealidad del método. Simultáneamente con las muestras, analizar dos estándares a la concentración nominal de trabajo (0.012 mg/mL para Clorhidrato de Lidocaína y 0.16 mg/mL para Clotrimazol), para reportar los resultados de exactitud (Porcentaje de Recuperación), según Tabla N°33 y N°36.

$$\% R = \frac{X_H}{X_A} \times 100$$

Donde:

$X_H$  = Cantidad de analito hallado  
 $X_A$  = Cantidad del analito añadido  
 $\% R$  = Porcentaje de Recuperación

- **CLORHIDRATO DE LIDOCAINA**

Peso St-1 : 15.40 mg

Peso St-2 : 14.90 mg

**Tabla N°31.** Áreas del estándar del clorhidrato de lidocaína

	<b>Estándar 1</b>	<b>Estándar 2</b>
AREAS	57.59667	55.98853
	57.41954	56.35404
	58.94682	55.74405
	59.30466	56.06932
	59.39601	55.57684
	59.10184	55.53326
	58.85650	55.86437
	58.90431	55.86810
PROMEDIO	58.69079	55.87481
RSD	1.29%	0.48%

$$\text{Factor de dilución (F)} = \frac{WS_t}{100} \times \frac{4}{50} \times \frac{25}{1} \times \frac{50}{5} \times \frac{25}{4}$$

$$F = 18.9375$$

**Tabla N°32.** Áreas de las muestras obtenidas para la exactitud del clorhidrato de lidocaína

<b>MUESTRA</b>	<b>80%</b>	<b>100%</b>	<b>120%</b>
M1	47.37623	54.81337	68.70691
	47.29856	54.57443	67.97997
M2	46.92209	56.91407	75.58947
	46.75539	56.87584	75.63373
M3	48.92960	57.69216	68.18482
	48.92822	57.95602	67.89880

$$\text{mg Hallado} = \frac{\text{Area Mta}}{\text{Area St}} \times F$$

**Tabla N°33.** Resultados de la exactitud del clorhidrato de lidocaína

Concentración	Ensayo	Añadido (mg)	Hallado (mg)	Recuperación %
80%	1	15.80	15.65	99.05
	2	15.40	15.48	100.55
	3	16.20	16.18	99.85
100%	1	18.20	18.08	99.35
	2	18.90	18.81	99.52
	3	19.20	19.12	99.56
120%	1	22.90	22.59	98.66
	2	25.10	25.00	99.59
	3	22.30	22.49	100.87
Promedio				99.67
RSD (%)				0.7

- CLOTRIMAZOL**

Peso St-1 : 50.60 mg

Peso St-2 : 51.80 mg



**Tabla N°34.** Áreas del estándar de clotrimazol

	<b>Estándar 1</b>	<b>Estándar 2</b>
AREAS	828.20819	843.08087
	827.10046	842.49042
	827.85571	842.82703
	828.93433	842.79688
	830.32922	843.72406
	831.03625	844.00446
	830.53845	844.87744
	831.84149	844.50433
PROMEDIO	829.48051	843.53819
RSD	0.2%	0.1%

$$\text{Factor de dilución (F)} = \frac{\text{WSt}}{25} \times \frac{4}{50} \times \frac{50}{1} \times \frac{25}{4}$$

$$F = 51.2000$$

**Tabla N°35.** Áreas de las muestras obtenidas para la exactitud del clotrimazol

<b>MUESTRA</b>	<b>80%</b>	<b>100%</b>	<b>120%</b>
M1	659.16864	828.24243	964.52454
	659.06573	828.03204	965.62091
M2	684.31207	871.33002	998.41815
	685.80334	871.15088	996.99518
M3	663.29663	813.44153	1033.69751
	663.40826	813.22711	1033.40320

$$\text{mg Hallado} = \frac{\text{Area mp}}{\text{Area st}} \times F$$

**Tabla N°36.** Resultados de la exactitud del clotrimazol

Concentración	Ensayo	Añadido (mg)	Hallado (mg)	Recuperación %
80%	1	40.60	40.34	99.37
	2	42.00	41.93	99.83
	3	40.70	40.60	99.76
100%	1	51.70	50.69	98.04
	2	53.50	53.33	99.67
	3	50.00	49.78	99.56
120%	1	60.00	59.07	98.45
	2	62.10	61.07	98.34
	3	63.00	63.26	100.41
Promedio				99.27
RSD (%)				0.8

#### e) Precisión del Método

##### – Repetibilidad

Este parámetro se analizó y evaluó en 6 muestras de un lote, según método analítico propuesto, donde se determina la Desviación Estándar (S) y el Coeficiente de Variación (RSD), según tabla N°37 y N°38 .<sup>(9) (10)</sup>

- **CLORHIDRATO DE LIDOCAINA**

**Tabla N°37.** Resultados del análisis de la repetibilidad del clorhidrato de lidocaína

<b>Muestra Nº</b>	<b>Peso Muestra (g)</b>	<b>mg / óvulo hallados</b>	<b>%</b>
1	1.5323	7.0207	100.2958
2	1.5396	6.9000	98.5721
3	1.5206	6.8360	97.6568
4	1.5089	7.0204	100.2918
5	1.5844	6.9860	99.7997
6	1.4981	6.8984	98.5486
Promedio		6.9436	99.1941
Desviación Estándar (s)			0.08
Desviación Estándar Relativa (RSD)			1.1

- **CLOTRIMAZOL**

**Tabla N°38.** Resultados del análisis de la repetibilidad del clotrimazol

<b>Muestra Nº</b>	<b>Peso Muestra (g)</b>	<b>mg / óvulo hallados</b>	<b>%</b>
1	1.5323	101.7451	101.7451
2	1.5396	102.0293	102.0293
3	1.5206	101.6790	101.6790
4	1.5089	101.1522	101.1522
5	1.5844	100.9222	100.9222
6	1.4981	99.8426	99.8426
Promedio		101.2284	101.2284
Desviación Estándar (s)			0.791
Desviación Estándar Relativa % (RSD)			0.8

- **Precisión Intermedia**

Un segundo analista evaluó y analizó otro día 6 muestras del mismo lote empleado en la repetibilidad, según método analítico propuesto, donde se determina la Desviación Estándar (S) y el Coeficiente de Variación (RSD), según Tabla N°39 y N°41. <sup>(9) (10)</sup>

• **CLORHIDRATO DE LIDOCAINA**

**Tabla N°39.** Resultados del análisis del clorhidrato de lidocaína por otro analista

<b>Muestra Nº</b>	<b>Peso Muestra (g)</b>	<b>mg / óvulo hallados</b>	<b>%</b>
1	1.5272	6.9314	99.0202
2	1.5484	7.0352	100.5022
3	1.5029	7.0267	100.3809
4	1.5693	6.9747	99.6384
5	1.5333	6.8724	98.1768
6	1.5156	7.0739	101.0552
Promedio		6.9857	99.7956
Desviación Estándar (s)			1.07
Desviación Estándar Relativa % (RSD)			1.1

**Tabla N°40.** Comparación de resultados obtenidos de la precisión intermedia de clorhidrato de lidocaína

Nº	ANALISTA 1	ANALISTA 2
1	100.30	99.02
2	98.57	100.50
3	97.66	100.38
4	100.29	99.64
5	99.80	98.18
6	98.55	101.06
Promedio	99.49	
RSD (%)	1.1	

- CLOTRIMAZOL**

**Tabla N°41.** Resultados del análisis de clotrimazol por otro analista

Muestra Nº	Peso Muestra (g)	mg / óvulo hallados	%
1	1.5272	100.7903	100.7903
2	1.5484	102.6148	102.6148
3	1.5029	102.9860	102.9860
4	1.5693	101.1987	101.1987
5	1.5333	102.8014	102.8014
6	1.5156	102.6742	102.6742
Promedio		102.1776	102.1776
Desviación Estándar (s)			0.93
Desviación Estándar Relativa % (RSD)			0.9

**Tabla N°42.** Comparación de resultados obtenidos de la precisión intermedia de clotrimazol

Nº	ANALISTA 1	ANALISTA 2
1	101.75	100.79
2	102.03	102.61
3	101.68	102.99
4	101.15	101.20
5	100.92	102.80
6	99.84	102.67
Promedio	101.70	
RSD (%)	0.9	

**f) Especificidad – Degradaciones**

**Determinación de interferencia de productos de degradación:**

Se analiza el placebo, el principio activo y muestras con los siguientes métodos de degradación artificial:

- Hidrólisis ácida, por calentamiento en baño maría con HCl 0.1N por 2 horas y posterior neutralización con NaOH 0.1 N.
- Hidrólisis alcalina, por calentamiento en baño maría con NaOH 0.1N por 2 horas y posterior neutralización con HCl 0.1N.
- Oxidación, por 2 horas en baño maría con 5 gotas de Peróxido de Hidrógeno al 30%.
- Termólisis, por calentamiento de la droga en estufa a 80°C por 15 horas
- Fotólisis, exposición en lámpara de luz UV por 5 días.

**Tabla N°43.** Resultados de la degradación de la hidrólisis ácida del clorhidrato de lidocaína y clotrimazol

<b>HIDROLISIS ACIDA</b>					
MUESTRA	PLACEBO (%)	Clorhidrato de Lidocaína		Clotrimazol	
		P.A (%)	MUESTRA (%)	P.A (%)	MUESTRA (%)
M <sub>1</sub>	0.00	98.55	98.35	18.54	35.95
M <sub>2</sub>	0.00	98.64	99.46	18.48	35.99
PROMEDIO	0.00	98.59	98.90	18.51	35.97
RSD	0.00%	0.07%	0.8%	0.2%	0.08%

**Tabla N°44.** Resultados de la degradación de la hidrólisis básica del clorhidrato lidocaína y clotrimazol

<b>HIDROLISIS ALCALINA</b>					
MUESTRA	PLACEBO (%)	Clorhidrato de Lidocaína		Clotrimazol	
		P.A (%)	MUESTRA (%)	P.A (%)	MUESTRA (%)
M <sub>1</sub>	0.00	99.15	98.93	15.72	37.69
M <sub>2</sub>	0.00	98.97	98.42	15.65	37.80
PROMEDIO	0.00	99.06	98.68	15.69	37.75
RSD	0.00%	0.1%	0.4%	0.3%	0.2%

**Tabla N°45.** Resultados de la degradación de la oxidación del clorhidrato de lidocaína y clotrimazol

<b>OXIDACION</b>					
MUESTRA	PLACEBO (%)	Clorhidrato de Lidocaína		Clotrimazol	
		P.A (%)	MUESTRA (%)	P.A (%)	MUESTRA (%)
M <sub>1</sub>	0.00	98.00	84.93	98.34	92.17
M <sub>2</sub>	0.00	98.79	85.74	98.43	93.71
PROMEDIO	0.00	98.39	85.34	98.39	92.94
RSD	0.00%	0.6%	0.7%	0.06%	1.2%

**Tabla N°46.** Resultados de la degradación de la termólisis del clorhidrato de lidocaína y clotrimazol

TERMOLISIS					
MUESTRA	PLACEBO (%)	Clorhidrato de Lidocaína		Clotrimazol	
		P.A (%)	MUESTRA (%)	P.A (%)	MUESTRA (%)
M <sub>1</sub>	0.00	99.22	99.42	99.86	91.81
M <sub>2</sub>	0.00	99.86	99.72	99.69	92.04
PROMEDIO	0.00	99.54	99.57	99.78	91.93
RSD	0.00%	0.5%	0.2%	0.1%	0.2%

**Tabla N°47.** Resultados de la degradación de la fotólisis UV del clorhidrato de lidocaína y clotrimazol

FOTOLISIS (UV)					
MUESTRA	PLACEBO (%)	Lidocaína Clorhidrato		Clotrimazol	
		P.A (%)	MUESTRA (%)	P.A (%)	MUESTRA (%)
M <sub>1</sub>	0.00	99.85	98.14	99.94	97.22
M <sub>2</sub>	0.00	98.54	98.64	99.92	97.94
PROMEDIO	0.00	99.19	98.39	99.93	97.58
RSD	0.00%	0.93%	0.4%	0.01%	0.5%



## IV. RESULTADOS

### CERTIFICADO DE VALIDACION DE METRONIDAZOL

PARAMETRO	LIMITES	RESULTADOS
Especificidad: Interferencia debido a excipientes y/o degradados	Ausencia de interferencia	Conforme
Linealidad  a) Sistema  Ecuación de la Recta:  Coeficiente de Determinación  Test de ANOVA  Coeficiente de Variación de las Respuestas encontradas (f)	$y = bx + a$  Mayor a 0,995  $F_{exp} > F_{tabla}$  $\leq 2\%$	$y = 14362.137 x + 3.592$  0.99996  $350787.45 > 4.667$  0.2%
b) Método  Ecuación de la Recta:  Coeficiente de Determinación  Test de ANOVA  Coeficiente de Variación de las Respuestas encontradas (f)	$y = bx + a$  Mayor a 0.995  $F_{exp} > F_{tabla}$  $\leq 2\%$	$y = 14581.734 x - 25.300$  0.9997  $20705.111 > 5.591$  0.3%

<u>Exactitud:</u> Porcentaje de Recuperación:	98% - 102%	100.53%
<u>Precisión</u>  Precisión Instrumental: De los Tiempos de retención De las Áreas  Repetibilidad  Precisión Intermedia	RSD ≤ 2% RSD ≤ 2%  RSD ≤ 2%  RSD ≤ 2%	0.1% 0.1%  0.6%  1.5%
Robustez Estabilidad de la muestra después de 24 horas en refrigeración	RSD ≤ 2% /d/ ≤ 2%	1.1% 1.6%

## CERTIFICADO DE VALIDACION DEL CLORHIDRATO DE LIDOCAINA

PARAMETRO	LIMITES	RESULTADOS
Especificidad: Interferencia debido a excipientes y/o degradados	Ausencia de interferencia	Conforme
Linealidad  a) Sistema  Ecuación de la Recta:  Coeficiente de Determinación  Test de ANOVA  Coeficiente de Variación de las Respuestas encontradas (f)	$y = bx + a$  Mayor a 0,995  $F_{exp} > F_{tabla}$  $\leq 2\%$	$y = 5071.889 x - 1.208$  0.999  $12876.984 > 4.667$  1.4%
b) Método  Ecuación de la Recta:  Coeficiente de Determinación  Test de ANOVA  Coeficiente de Variación de las Respuestas encontradas (f)	$y = bx + a$  Mayor a 0.995  $F_{exp} > F_{tabla}$  $\leq 2\%$	$y = 5006.56 x - 25.300$  0.9983  $4122.4105 > 5.591$  0.7%

<u>Exactitud:</u> Porcentaje de Recuperación:	98% - 102%	99.67 %
<u>Precisión</u>  Precisión Instrumental: De los Tiempos de retención De las Áreas  Repetibilidad  Precisión Intermedia	RSD ≤ 2% RSD ≤ 2%  RSD ≤ 2%  RSD ≤ 2%	0.1% 0.6%  1.1%  1.1%

## CERTIFICADO DE VALIDACION DE CLOTRIMAZOL

PARAMETRO	LIMITES	RESULTADOS
Especificidad: Interferencia debido a excipientes y/o degradados	Ausencia de interferencia	Conforme
Linealidad  a) Sistema  Ecuación de la Recta:  Coeficiente de Determinación  Test de ANOVA  Coeficiente de Variación de las Respuestas encontradas (f)	$y = bx + a$  Mayor a 0,995  $F_{exp} > F_{tabla}$  $\leq 2\%$	$y = 5117.294 x + 3.426$  0.9997  $41085.46 > 4.667$  0.6%
b) Método  Ecuación de la Recta:  Coeficiente de Determinación  Test de ANOVA  Coeficiente de Variación de las Respuestas encontradas (f)	$y = bx + a$  Mayor a 0.995  $F_{exp} > F_{tabla}$  $\leq 2\%$	$y = 5035.08 x + 8.534$  0.9975  $2750.0757 > 5.591$  0.8%

<u>Exactitud:</u> Porcentaje de Recuperación:	98% - 102%	99.27 %
<u>Precisión</u>  Precisión Instrumental: De los Tiempos de retención De las Áreas  Repetibilidad  Precisión Intermedia	  RSD ≤ 2% RSD ≤ 2%  RSD ≤ 2%  RSD ≤ 2%	  0.1% 0.1%  0.8%  0.9%

## V. DISCUSION

- a) En relación al desarrollo de la técnica analítica, al momento de analizar con el sistema cromatográfico del clorhidrato de lidocaína y el clotrimazol, se observa que también eluye el metronidazol, lo cual se podría utilizar este sistema cromatográfico para cuantificar los 3 principios activos en un solo análisis, por lo tanto, nos facilitaría el trabajo de solo realizar un solo sistema cromatográfico. La propuesta se rechaza ya que el Metronidazol al tener 500 mg de principio activo en el óvulo, evidencia un pico demasiado grande en referencia a la altura y área. Esto hace que no se puedan evidenciar los picos de clorhidrato de lidocaína y clotrimazol definitivamente, ya que al tener cantidades de 7 mg y 100 mg en el óvulo, respectivamente, eluyen picos demasiado pequeños en altura y área, por lo tanto, se decidió separar el metronidazol en un sistema cromatográfico diferente al del clorhidrato de lidocaína y el clotrimazol evidenciando resultados confiables, seguros y precisos.
- b) Para afianzar el método analítico se realizó una exactitud como prueba de pre validación antes de validarlo, en donde el metronidazol, con el nuevo sistema cromatográfico eluye solo sin ninguna interferencia del placebo, medio de extracción y principios activos (clotrimazol y lidocaína clorhidrato) obteniendo una recuperación del 100%. También se realizó para el clotrimazol y el clorhidrato de lidocaína obteniendo una recuperación del 100%, usando el sistema cromatográfico propuesto diferente al metronidazol.

- c) En el estudio de especificidad para los 3 principios activos, metronidazol, clotrimazol y clorhidrato de lidocaína, comparando los cromatogramas del estándar y de la muestra dieron respuesta al mismo tiempo de retención de cada analito. Los cromatogramas de placebo y medios de extracción no mostraron respuesta en los tiempos de retención de los analitos de interés. Además, al realizar degradaciones forzadas de cada uno de los analitos de interés, se evidencia que los posibles productos de degradación no interfieren en los tiempos de retención de cada analito.
- d) Los gráficos de respuesta vs concentración para el metronidazol, clotrimazol y clorhidrato de lidocaína demuestran que el método por HPLC produce una respuesta lineal para el principio activo como las muestras. Las ecuaciones de las rectas obtenidas en la linealidad del sistema y método demuestran que la técnica responde linealmente en el rango de trabajo empleado.
- e) Para el parámetro de exactitud, los resultados obtenidos cumplen con los criterios de aceptación permitidos para el metronidazol, clotrimazol y clorhidrato de lidocaína (98% - 102%)
- f) Con respecto a la Precisión Intermedia, los resultados entre analistas mostraron resultados con un RSD < 2%, por lo que se puede asegurar, que la nueva técnica analítica presenta resultados fiables.



## **VI. CONCLUSIONES**

1. La técnica analítica desarrollada para la cuantificación de Metronidazol 500 mg, Clotrimazol 100 mg y lidocaína clorhidrato 7 mg en óvulos vaginales por cromatografía de líquidos (HPLC), cumple con los parámetros de desempeño de la validación.
2. Se estableció un método de análisis por cromatografía de líquidos (HPLC) para cuantificar Metronidazol, clotrimazol y clorhidrato de lidocaína con sistemas cromatográficos óptimos y preparación de estándares y muestras adecuados.
3. La técnica analítica propuesta para la cuantificación de Metronidazol, clotrimazol y clorhidrato de lidocaína en óvulos vaginales por cromatografía de líquidos (HPLC), cumple con los parámetros de desempeño de la validación.
4. Se elaboró un certificado de validación cumpliendo la conformidad del medicamento respecto a sus especificaciones propias del mismo.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Merck Research Laboratories, "THE INDEX MERCK AN ENCYCLOPEDIA OF CHEMICALS DRUGS, AND BIOLOGICALS", 14 ed. New Jersey, 2006
2. Florez J. Farmacología Humana, 4 ed. Barcelona, Masson S.A., 2003
3. United States Pharmacopeial Convention Inc., United States Pharmacopeia 38 NF-33, 2015
4. Yost,R.; Ettre, L.; Colon, R. "INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA Practica".Ed. Perkin Elmer Corporation. E.E.U.U. 1980; 32-37.
5. Agencia Española de Medicamentos y Productos sanitarios, anexo 15 "CUALIFICACIÓN Y VALIDACIÓN". España. [Con fecha de acceso el 28 de Junio del 2012]. Web disponible en: [www.agemed.es/actividad/sglInspeccion/docs/28-anexo15.pdf](http://www.agemed.es/actividad/sglInspeccion/docs/28-anexo15.pdf)
6. A laboratory guide to method validation and related topics. The Fitness for Purpose of Analytical Methods. Eurachem Guide. Guía para la validación de métodos de ensayo. OAA.DC-LE-05. 2009. [Con fecha de acceso el 26 de Junio del 2012]. Web disponible en: [http://www.suelos.org.ar/adjuntos/validacion\\_metodos\\_analiticos.pdf](http://www.suelos.org.ar/adjuntos/validacion_metodos_analiticos.pdf).
7. AEFI. "VALIDACION DE METODOS ANALITICOS". Monografía AEFI. Barcelona - España , 2001; 23-36, 46-85.
8. The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use [página en internet], Bruselas; [actualizado el 31 mayo 2007; citado 2 Junio 2007]. ICH

Harmonised Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedures text and methodology Q2 (R1); Web disponible en: <http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>

9. Douglas C., "CONTROL ESTADISTICO DE LA CALIDAD". Limusa Wiley. 3 Ed. 2005
10. Skoog D, Análisis Instrumental, 4ta ed. Madrid, Mc GrawHill Interamericana España S.A, 1994.
11. Morales, C.: "DESARROLLO Y VALIDACION PROSPECTIVA DE UNA TECNICA ANALITICA POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC) PARA ENALAPRIL 10 mg TABLETAS RECUBIERTAS". Tesis de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima-Perú. 2008. [Con fecha de acceso el 26 Junio del 2012]. Web disponible en: <http://sisbib.unmsm.edu.pe/BibVirtual/bibvirtual.asp>
12. Villegas, J.; VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE PARA LA VALORACIÓN DE PREDNISONA, EN NISONA SUSPENSIÓN 10 mg/5 mL". Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional de Trujillo. Lima; 2008.
13. Silva C. "VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE VALORACIÓN DE GLIMPERIDE PRESENTACIÓN COMPRIMIDOS DE 4 mg POR EL MÉTODO DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE HPLC". [Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico] Facultad de

Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima; 2004.

14. Tarazona B. "VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO DE VALORACIÓN DEL DOBESILATO DE CALCIO 500 mg CAPSULA POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN UV VISIBLE". [Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico] Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima; 2001.
15. Rosso, A. "Criterios de Validación en métodos analíticos instrumentales para la industria farmacéutica. Centro de Investigación y Desarrollo en Química y Petroquímica (CEQUIPE)", Ciudad de Mexico, 2002
16. Rampazoo, P. "Standarization and validation of Analytical methods in the pharmaceutical industry." *Il Farmaco* 1990, 45: 807-15
17. Cornelas, L. "Desarrollo de métodos en HPLC". Barcelona. Instituto Químico de Sarria, (1194):68.
18. Camacho, M. "Validation protocol of Analytical methods for finished pharmaceutical products." *ATP Pharma Practique* 1993, 3(3): 197-202
19. Quattrochi, O. "Introducción a la HPLC: aplicación y práctica" Buenos Aires: Artes Gráficas Farro, (1992):301
20. Alonso, J. "Tecnología Farmacéutica" Madrid. Editorial Sintesis. Vol. 2: Formas farmacéuticas. (1997)
21. Carcamo, E. "Control de calidad biofarmacéutico de medicamentos" Ediciones Universidad Católica de Chile (1192)

- 22.** David, A. “Calificación, Validación y Verificación”. Pharmaceutical Technology. (2007) Pág. 34 – 38
- 23.** Badillo, M. “Validación de Procesos” Diplomado de Buenas Prácticas de Manufactura (2005)

## **VII. ANEXOS**

### **INDICE DE FIGURAS**

**Figura N°1** - Estructura molecular del metronidazol

**Figura N°2** - Estructura molecular del clotrimazol

**Figura N°3** - Estructura molecular del clorhidrato de lidocaína

**Figura N°4** – Estándar de metronidazol

**Figura N°5** – Estándar de clorhidrato de lidocaína y clotrimazol

**Figura N°6** – Muestra de metronidazol en óvulos vaginales

**Figura N°7**– Muestra de clorhidrato de lidocaína y clotrimazol en óvulos vaginales

**Figura N°8** – Placebo de metronidazol en óvulos vaginales

**Figura N°9** – Placebo de clorhidrato de lidocaína y clotrimazol en óvulos vaginales

**Figura N°10** – Medio de extracción del metronidazol

**Figura N°11** – Medio de extracción para clorhidrato de lidocaína y clotrimazol

**Figura N°12** – Representación gráfica de los datos obtenidos en la linealidad del sistema de metronidazol

**Figura N°13** – Representación gráfica de los datos obtenidos en la linealidad del método del metronidazol

**Figura N°14** – Representación gráfica de la linealidad del sistema del clorhidrato de lidocaína

**Figura N°15** – Representación gráfica de la linealidad del sistema de clotrimazol

**Figura N°16** – Representación gráfica de la linealidad del método del clorhidrato de lidocaína

**Figura N°17** – Representación gráfica de la linealidad del método de clotrimazol

## INDICE DE TABLAS

**Tabla N°1** – Datos requeridos para la validación

**Tabla N°2**– Estándares secundarios utilizados en la validación del método analítico

**Tabla N°3** – Datos obtenidos de la precisión instrumental del metronidazol

**Tabla N°4** – Datos del análisis de la regresión en la linealidad del sistema del metronidazol

**Tabla N°5** – Análisis de la varianza de la linealidad del sistema del metronidazol

**Tabla N°6** – Análisis de regresión en la linealidad del método del metronidazol

**Tabla N°7** – Análisis de la varianza de la linealidad del método del metronidazol

**Tabla N°8** – Áreas del estándar del metronidazol

**Tabla N°9** – Áreas de las muestras obtenidas para la exactitud del metronidazol

**Tabla N°10** – Resultados de la exactitud del metronidazol

**Tabla N°11** – Resultados del análisis de la repetibilidad del metronidazol

**Tabla N°12** – Resultados del análisis de metronidazol por otro analista

**Tabla N°13** – Comparación de resultados obtenidos de la precisión intermedia del metronidazol

**Tabla N°14** – Resultados del análisis inicial de la repetibilidad del metronidazol

**Tabla N°15** – Resultados de las muestras de repetibilidad después de 24 horas en refrigeración



**Tabla N°16**– Resultados de la estabilidad de la muestra de repetibilidad después de 24 horas a refrigeración

**TablaN°17** – Resultados de la degradación de la hidrólisis ácida del metronidazol

**TablaN°18**– Resultados de la degradación de la hidrólisis alcalina del metronidazol

**Tabla N°19** – Resultados de la degradación de la oxidación del metronidazol

**Tabla N°20** – Resultados de la degradación de la termólisis del metronidazol

**Tabla N°21** – Resultados de la degradación de la fotólisis UV del metronidazol

**TablaN°22**– Datos obtenidos de la precisión instrumental del clorhidrato de lidocaína y clotrimazol

**Tabla N°23** - Datos del análisis de la regresión en la linealidad del sistema del clorhidrato de lidocaína

**Tabla N°24** – Análisis de la varianza de la linealidad del sistema del clorhidrato de lidocaína

**TablaN°25**– Datos del análisis de regresión en la linealidad del sistema del clotrimazol

**Tabla N°26** – Análisis de la varianza de la linealidad del sistema del clotrimazol

**TablaN°27**– Datos del análisis de regresión en la linealidad del método del clorhidrato de lidocaína

**Tabla N°28** – Análisis de la varianza de la linealidad del método del clorhidrato de lidocaína

**Tabla N°29** – Datos del análisis de regresión en la linealidad del método del clotrimazol

**Tabla N°30** – Análisis de la varianza de la linealidad del método del clotrimazol

**Tabla N°31** – Áreas del estándar del clorhidrato de lidocaína

**Tabla N°32** – Áreas de la muestra obtenidas para la exactitud del clorhidrato de lidocaína

**Tabla N°33** – Resultados de la exactitud del clorhidrato de lidocaína

**Tabla N°34** – Áreas del estándar del clotrimazol

**Tabla N°35** – Áreas de las muestras obtenidas para la exactitud del clotrimazol

**Tabla N°36** – Resultados de la exactitud del clotrimazol

**Tabla N°37** – Resultados del análisis de la repetibilidad del clorhidrato de lidocaína

**Tabla N°38** – Resultados del análisis de la repetibilidad del clotrimazol

**TablaN°39** – Resultados del análisis del clorhidrato de lidocaína por otro analista

**TablaN°40**– Comparación de resultados de la precisión intermedia del clorhidrato de lidocaína

**Tabla N°41** – Resultados del análisis de clotrimazol por otro analista

**TablaN°42**– Comparación de resultados de la precisión intermedia del clotrimazol

**TablaN°43**–Resultados de la degradación de la hidrólisis ácida del clorhidrato de lidocaína y clotrimazol

**TablaN°44**—Resultados de la degradación de la hidrólisis básica del clorhidrato de lidocaína y clotrimazol

**TablaN°45**—Resultados de la degradación de la oxidación del clorhidrato de lidocaína y clotrimazol

**TablaN°46**—Resultados de la degradación de la termólisis del clorhidrato de lidocaína y clotrimazol

**TablaN°47**—Resultados de la degradación de la fotólisis UV del clorhidrato de lidocaína y clotrimazol